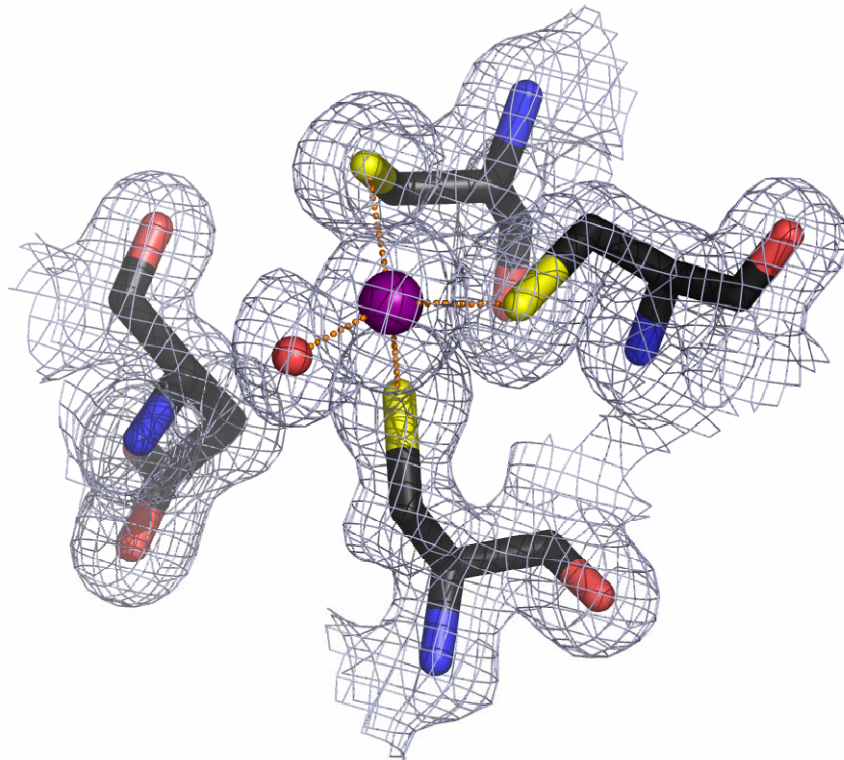


Die Porphobilinogensynthese aus *Pseudomonas aeruginosa*:

Katalytischer Mechanismus und Evolution der Metallabhängigkeit



Die Porphobilinogensynthese aus *Pseudomonas aeruginosa*:
Katalytischer Mechanismus
und Evolution der Metallabhängigkeit

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

Von Frederic Frère
aus Bad Kreuznach

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

2. Referent: Prof. Dr. Dirk Heinz

eingereicht am: 2. Dezember 2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15. Februar 2005

2006
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Frère, F., Schubert, W. D., Stauffer, F., Frankenberg, N., Neier, R., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2002). Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluorolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism. *J Mol Biol* 320, 237-47.

Moser, J. Frère, F., Heinz, D. W. Jahn, D. & Schubert, W. D. (2003). Glutamat auf Abwegen: Die tRNA-abhängige Tetrapyrrol-Biosynthese. *Biospektrum* 02/2003, 133-7.

Frère, F., Reents, H., Schubert, W.-D., Heinz, D. W. & Jahn D. (2004). Tracking the Evolution of Porphobilinogen Synthase Metal Dependence *in vitro*. *J Mol Biol*, (akzeptiert)

Tagungsbeiträge

Frère, F., Frankenberg, N., Fritzsche, H., W.-D., Heinz, D. W. & Jahn D: Structure and Function of the Porphobilinogen-Synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. (Vortrag) Meeting of the Tetrapyrrole Discussion Group, University of Leicester, 4. – 5. Januar, 2001

F. Frère , N. Frankenberg, R. Neier, D. Heinz and D. Jahn: Bacterial tetrapyrrole biosynthesis: Substrate recognition and catalytic mechanism of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. (Poster im Bereich Struktur und Funktion von Proteinen) Tagung der VAAM, Oldenburg, 25.-28.3.2001

Frere, F., Reents, H., Schubert, W. D., Stauffer, F., Frankenberg, N., Neier, R., Jahn, D. & Heinz, D. W.: *Pseudomonas aeruginosa* Porphobilinogen Synthase: Substrate Recognition, Catalytic Mechanism and Change of Metal Utilization. (Poster und Vortrag) Gordon Conference for Chemistry & Biology Of Tetrapyrroles, Newport, 14-19.7.2002

Frere, F., Reents, H., Schubert, W. D., Stauffer, F., Frankenberg, N., Neier, R., Jahn, D. & Heinz, D. W.: *Pseudomonas aeruginosa* Porphobilinogen Synthase: Catalytic mechanism and evolution of metal dependence. (Vortrag) The 5th Heart Of Europe Bio-Crystallography, Goslar, 25-27.09.2002

Meiner Familie und meinen Freunden

„Qualität ist, was einem zusagt.“

(frei nach Robert M. Pirsig)

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	3
2.1	Tetrapyrrole	3
2.1.1	Ein Überblick über die natürlichen Tetrapyrrole	3
2.2	Tetrapyrrolbiosynthese	5
2.2.1	Die Tetrapyrrolbiosynthese im Überblick	5
2.2.2	Regulation in der Tetrapyrrolbiosynthese	8
2.2.3	Krankheiten in Verbindung mit der Hämbiosynthese	8
2.2.4	Herbizide und Tetrapyrrolbiosynthese	9
2.3	Porphobilinogensynthasen	10
2.3.1	Allgemeines	10
2.3.2	Molekulare Struktur der Porphobilinogensynthase	11
2.3.3	Porphobilinogensynthase aus <i>P. aeruginosa</i>	14
2.4	Aufgabenstellung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Geräte und Chemikalien	17
3.1.1	Geräte	17
3.1.2	Chemikalien und Kits	17
3.2	Bakterienstämme und Plasmide	18
3.3	Kulturmedien und Medienzusätze	20
3.3.1	Medien	20
3.3.2	Zusätze	20
3.4	Mikrobiologische Techniken	21
3.4.1	Sterilisation	21

3.4.2 Wachstumsbedingungen	21
3.4.3 Bestimmung von Zelldichten	21
3.5 Molekularbiologische Techniken	22
3.5.1 Herstellung elektrokompenter Zellen	22
3.5.2 Transformation von Bakterien	22
3.5.3 Plasmidpräparation	23
3.5.4 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	24
3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese	24
3.5.6 Synthese von DNA-Primern	25
3.5.7 Einführung einer Punktmutation in ein Gen	26
3.5.8 DNA-Sequenzierung	27
3.6 Proteinchemische Methoden	27
3.6.1 Rekombinante Darstellung der Porphobilinogensynthase	27
3.6.1.1 Rekombinante Proteinsynthese	27
3.6.1.2 Zellkultivierung	28
3.6.1.3 Zellaufschluß	29
3.6.1.4 Erste Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose	29
3.6.1.5 Protease-Verdau	29
3.6.1.6 Konzentrierung	30
3.6.1.7 Dialyse	30
3.6.1.8 Zweite Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose	30
3.6.1.9 Anionen-Austausch-Chromatographie	30
3.6.1.10 Dialyse	31
3.6.1.11 Konzentrierung	31
3.6.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	31
3.6.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
3.6.4 Bestimmung der Aktivität der Porphobilinogensynthase (PBGS):	
Test nach Ehrlich	34
3.6.4.1 Inhibitionsversuche	35
3.6.4.2 Relative Enzymaktivität von PBGS-Mutanten	35
3.6.5.3 Bestimmung der pH-abhängigen Enzymaktivität der PBGS	35

3.6.5 Untersuchung der Bindung von Metallionen an Varianten von Porphobilinogensynthase mittels Equilibriumdialyse und Atomabsorptionsspektroskopie	37
3.7 Proteinkristallographie	38
3.7.1 Allgemeines	38
3.7.2 Kristallisation von Proteinen	38
3.7.3 Kryokristallographie	41
3.7.4 Strukturanalyse	42
3.7.4.1 Aufbau von Kristallen	42
3.7.4.2 Röntgenbeugung	43
3.7.4.3 Datensammlung	45
3.7.4.4 Bestimmung der Messstrategie	45
3.7.4.5 Datenauswertung und Datenreduktion	46
3.7.4.6 Phasierung	48
3.7.4.7 Modellbau und Verfeinerung	48
3.7.4.8 Qualität der Modellstrukturen	50
3.7.4.9 Hinterlegung der Daten bei RCSB Protein Data Bank	51
3.7.4.10 Anfertigung von Darstellungen der Proteinstrukturen	51
4 Ergebnisse und Diskussion	52
4.1 Der katalytische Mechanismus der PBGS aus <i>P. aeruginosa</i>	52
4.1.1 Grundlegende Überlegungen	52
4.1.2 Ergebnisse	53
4.1.2.1 Die Struktur des Komplexes aus PBGS D139N und 5-Fluorolävulinsäure	53
4.1.2.2 Die Struktur des Komplexes PBGS D139N/5F-LA im Überblick	53
4.1.2.3 Bindung von 5-FLA in A- und P-Stelle	55
4.1.2.4 Wechselwirkungen zwischen dem aktiven Zentrum und MgC	58
4.1.2.5 Ein monovalentes Kation im aktiven Zentrum	59
4.1.2.6 Mutierte Porphobilinogensynthasen	59
4.1.2.7 Inhibition der PBGS	61
4.1.3 Diskussion: Mechanismus der Porphobilinogensynthase aus <i>P. aeruginosa</i>	62

4.1.3.1	Substratbindung in der Porphobilinogensynthase aus <i>P. aeruginosa</i>	62
4.1.3.2	Der katalytische Mechanismus der Porphobilinogensynthase aus <i>P. aeruginosa</i>	66
4.2	Evolution der Metallabhängigkeiten in der Familie der Porphobilinogen- synthasen	70
4.2.1	Experimenteller Ansatz	70
4.2.2	Ergebnisse	72
4.2.2.1	Zn ²⁺ -Bindung und Zn ²⁺ -abhängige Enzymaktivität	72
4.2.2.2	Kristallstrukturen der neuen Varianten von <i>Pa</i> PBGS	75
4.2.3	Diskussion	83
4.2.3.1	Vergleich der Varianten von <i>Pa</i> PBGS	83
4.2.3.2	Evolution der Porphobilinogensynthasen	84
4.2.3.3	Die Funktion von ZnB	85
5	Zusammenfassung und Ausblick	87
5.1	Zusammenfassung	87
5.2	Ausblick	88
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhänge	97
	Anhänge 1 – 3	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Abkürzungen

5F-LA	5-Flourlävulinsäure
AAS	Atomabsorptionschromatographie
A_λ	Absorption bei der Wellenlänge λ in nm
ALA	5-Aminolävulinsäure
APS	Aminoperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bis-tris-propan	1,3-Bis-[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-propan
DMBA	4-Dimethylaminobenzaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOSA	4,7-Dioxosebacinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (meist als Dinatriumsalz vorliegend)
<i>EcPBGS</i>	Porphobilinogensynthase aus <i>Escherichia coli</i>
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie (Fast protein liquid chromatography)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration die zur 50 %-igen Inhibition führt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LA	Lävulinsäure
min	Minute(n)
M_r	relative molekulare Masse
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Na-MES	Natriumsalz der β -Morpholinoethansulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
OD $_\lambda$	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ in nm
OSA	4-Oxosebacinsäure
<i>PaPBGS</i>	Porphobilinogensynthase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PBGS	Porphobilinogensynthase
PBG	Porphobilinogen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
ScPBGS	Porphobilinogensynthase aus <i>Saccharmyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wild-Typ
w/v	Gewicht pro Volumen

2 Einleitung

2.1 Tetrapyrrole

2.1.1 Ein Überblick über die natürlichen Tetrapyrrole

Tetrapyrrole sind Kofaktoren und prosthetische Gruppen für verschiedenste Proteine. Sie sind an Prozessen der Energiekonservierung, des Sauerstofftransport, an Redox-Reaktionen und an Methylierungsreaktionen entscheidend beteiligt. Erst die besonderen Eigenschaften der Tetrapyrrole versetzen die jeweiligen Proteine in die Lage diese Prozesse durchzuführen.

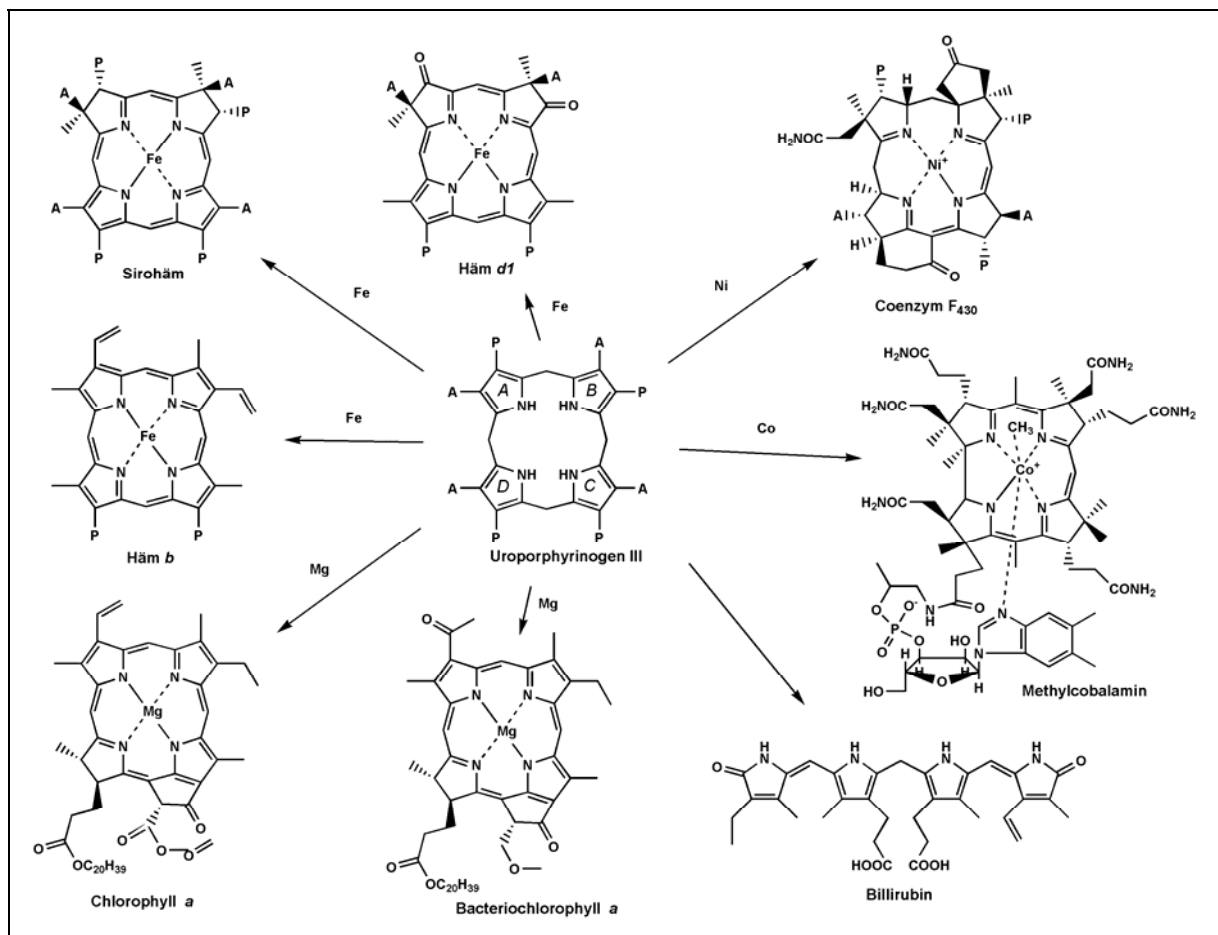


Abb. 1: Vertreter der acht Klassen von Tetrapyrrolen mit Uroporphyrinogen III als allgemeinem Vorläufer, A: Acetatseitengruppe ($-\text{CH}_3\text{COOH}$), P: Propionatseitengruppe ($-\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$), V: Vinylseitengruppe ($-\text{C}_2\text{H}_3$)

Ihre Struktur erschließt sich teilweise aus ihrem Namen – Tetrapyrrole. Sie sind aus 4 Pyrrol-ringen aufgebaut, die über Methinbrücken miteinander verknüpft sind. Sie kommen in linearer Form vor oder als geschlossener Makrozyklus (**Abb. 1**). Bei den Corrinoïden (Methylcobala-

min) wird während der Biosynthese die Methinbrücke zwischen den Ringen A und D eliminiert.

Abbildung 1 stellt Vertreter der acht Klassen von Tetrapyrrolen ¹ dar:

- | | |
|-------------------------|---|
| 1) Sirohäm | (Porphonoidgrundgerüst) |
| 2) Häm d_1 | (Porphonoidgrundgerüst) |
| 3) Coenzym F_{430} | (Porphonoidgrundgerüst), |
| 4) Corrinoide | (z. B. Methylcobalamin; Corrinoidegrundgerüst), |
| 5) Chlorophylle | (Chlorine) |
| 6) Bacteriochlorophylle | (Chlorine) |
| 7) Häme | (Porphyringrundgerüst). |
| 8) lineare Tetrapyrrole | (Biline) |

Ihre vielfältigen Fähigkeiten entwickeln Tetrapyrrole in der Kombination mit den Übergangsmetallionen Fe^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} sowie dem Erdalkalimetall Mg^{2+} . Die Metallionen werden jeweils im Zentrum der Pyrrolringe gebunden, koordiniert von den 4 Stickstoffatomen ^{1; 2}. In der Stoffgruppe der natürlichen Tetrapyrrole finden sich unterschiedlichste Variationen des Systems der konjugierten Doppelbindungen bzw. des aromatischen Systems. Ebenso variiert die Konformation des Makrozyklus, zwischen eben und gewölbt. Dadurch wird die Koordinationssphäre und damit das Ligandenfeld der Metallionen gezielt moduliert und mithin die elektronische Struktur des zentralen Metallions optimal auf die jeweilige Aufgabe angepasst. Als Beispiele seien die konformationellen Änderungen des Häms im Hämoglobin genannt, bei O_2 - bzw. CO_2 -Aufnahme und -Abgabe, oder die besondere Reaktivität der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung in Methylcobalamin und 5'-Desoxyadenosylcobalamin ^{3; 4}. Auch die Redoxaktivität der Cytochrome wird unter anderem durch diese Mechanismen moduliert. Bei den metallfreien, offenkettigen Phytochromen nutzt die Natur hingegen die elektronischen Eigenschaften des konjugierten Systems der Doppelbindungen als Photorezeptor. Strahlung einer bestimmten Wellenlänge induziert eine cis-/trans- Isomerie die zu konformationellen Veränderungen im Rezeptor führen, ähnlich den Vorgängen im Rhodopsin ⁵.

2.2 Tetrapyrrolbiosynthese

2.2.1 Die Tetrapyrrolbiosynthese im Überblick

Die Tetrapyrrolbiosynthese ist ein zentraler Stoffwechselweg in der Natur. **Abbildung 2** gibt eine Übersicht über die verschiedenen Endprodukte und die Vorstufen aus denen sie gebildet werden.

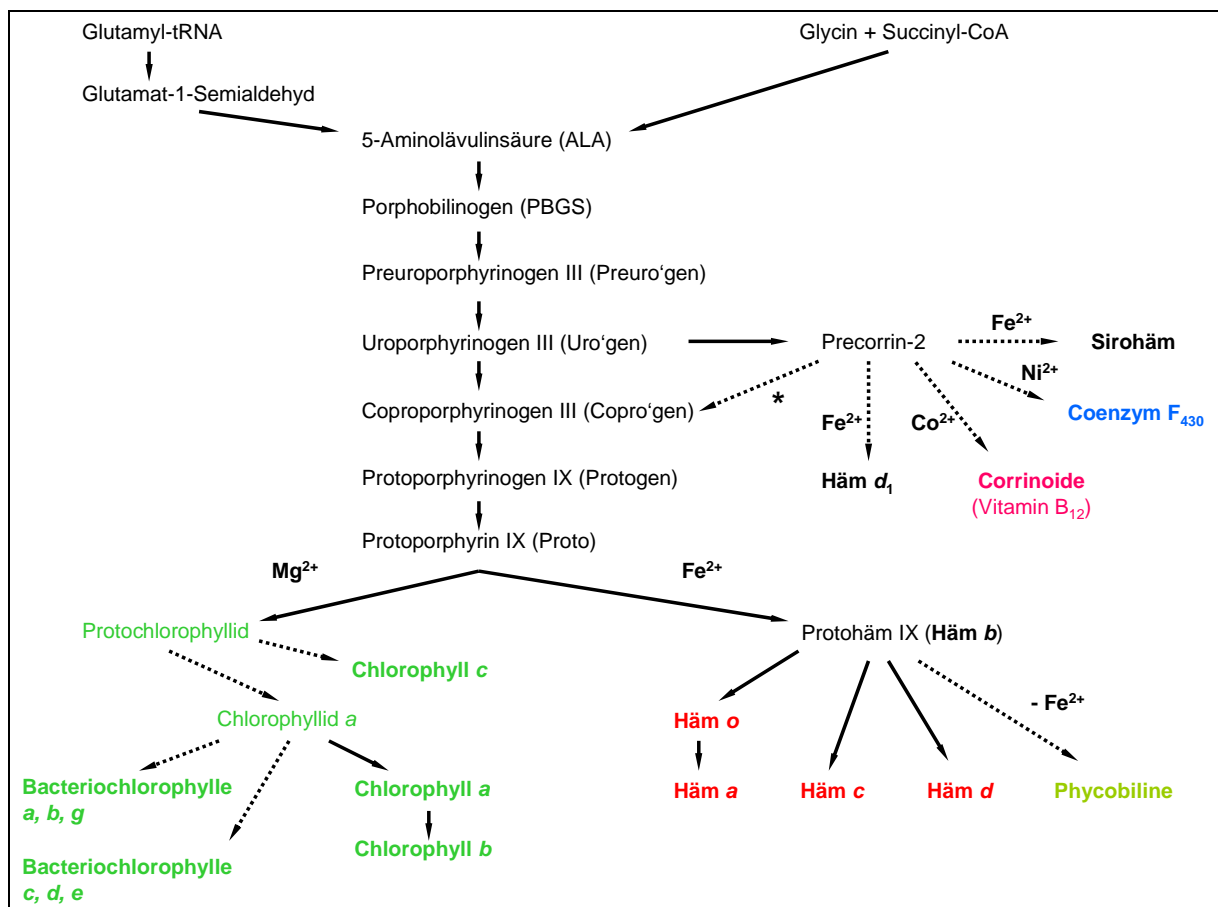


Abb. 2: Übersicht zur Tetrapyrrolbiosynthese anhand der Metaboliten. Gestrichelte Pfeile markieren mehrfache Umsetzungen, oder noch unaufgeklärte Synthesewege, durchgehende Pfeile markieren bekannte Reaktionen. *: postulierte, alternative Syntheseroute zu Coproporphyrinogen in *Desulfovibrio vulgaris* ⁶.

Wahrscheinlich entwickelte sich in der Evolution zuerst der Syntheseweg über Uroporphyrinogen III und Precorrin-2 zu Vitamin B₁₂ (^{3; 7}, **Abb. 2**). Aus Precorrin-2 werden heute außerdem F₄₃₀ (methanogene Archaea) und Sirohäm gebildet (**Abb. 2**). Erst später entwickelte sich dann der Syntheseweg von Uroporphyrinogen III über Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX als allgemeiner Vorläufer für Häme und Phycobiline, sowie Chlorophylle und Bacteriochlorophylle. Häme besitzen als Kofaktoren essentielle Bedeutung bei der respiratorischen Energiegewinnung (Cytochrome), beim Sauerstofftransport in höheren Tieren

(Hämoglobins), sowie bei einer Vielzahl essenzieller Redoxreaktionen (Katalasen, Peroxidasen). Gleiches gilt für Chlorophylle und Bakteriochlorophylle in der pflanzlichen und der bakteriellen Photosynthese bei der Umwandlung von Strahlungsenergie in chemische Energie. Allen Synthesewegen natürlicher Tetrapyrrole gemeinsam sind die Reaktionsschritte zwei bis vier, von 5-Aminolävulinsäure (ALA) zu Uroporphyrinogen III (**Abb. 3**). Bei der Synthese von ALA findet man zwei alternative Reaktionswege, bei denen zwei unterschiedliche Substratquellen genutzt werden (**Abb. 3**). Im „C₅-Weg“⁸, der von Pflanzen, Archaeen und fast allen Bakterien verwendet wird, wird Glutamyl-tRNA aus der Proteinbiosynthese abgezweigt. Dieser aktivierte Glutamathioester wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion von der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) zum entsprechenden Aldehyd reduziert. Im Anschluß wird das reaktive Zwischenprodukt, Glutamat-1-semialdehyd, vermutlich durch direkte Produktweiterleitung, auf die Transaminase Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase (GSAM) übertragen und in 5-Aminolävulinsäure (ALA) überführt^{9; 10; 11}. Im anderen Biosyntheseweg, wie er in α -Proteobakterien, Pilzen und Tieren gefunden wird (Shemin-Weg), werden zur Synthese dieser Verbindung Succinyl-CoA aus dem Citrat-Zyklus und Glycin in einer Einzschrittreaktion durch die 5-Aminolävulinsäuresynthase (ALAS) zur 5-Aminolävulinsäure (ALA) kondensiert, unter Freisetzung von CO₂.

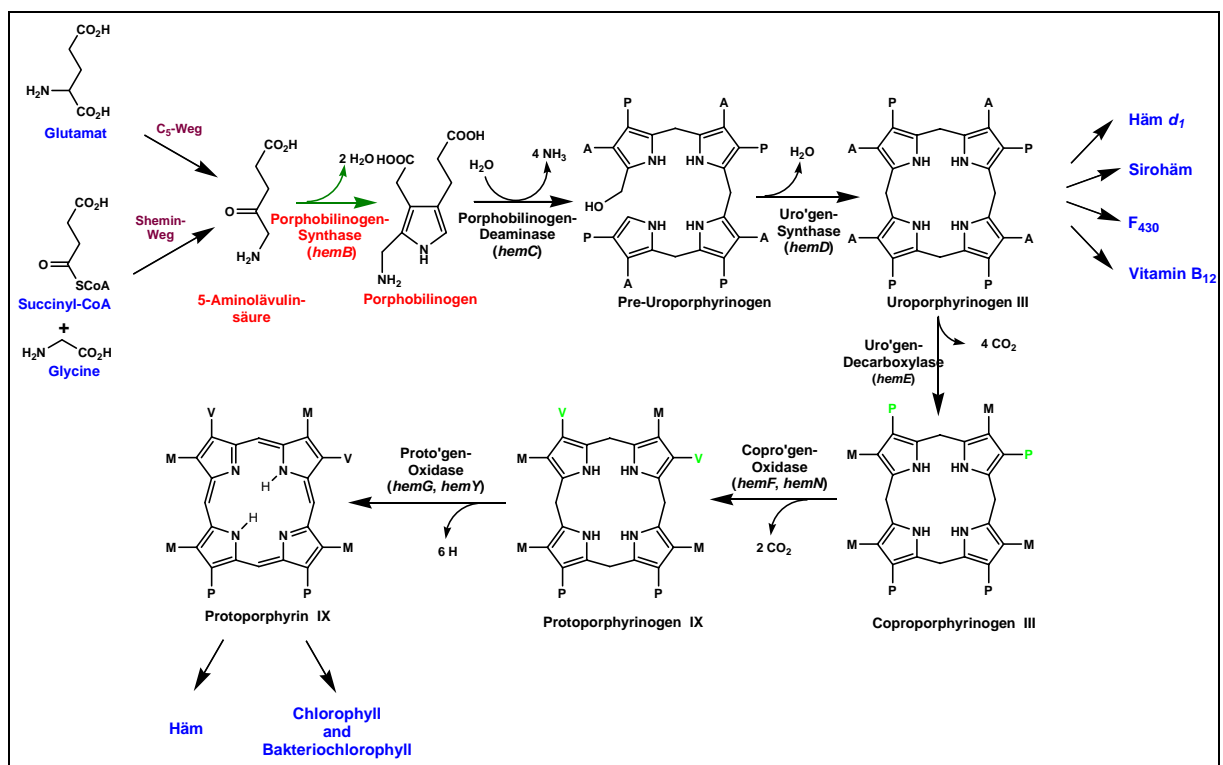


Abb. 3: Übersicht über die Reaktionsschritte von Glutamat bzw. Succinyl-CoA und Glycin zum Protoporphyrin IX. P: Propionatseitengruppe (-C₂H₅COOH), A: Acetatseitengruppe (-CH₃COOH), P: Propionatseitengruppe (-C₂H₅COOH), V: Vinylseitengruppe (-C₂H₃)

Interessanterweise sind ALAS und GSAM, betrachtet man die Sekundär- und Tertiärstruktur, strukturell eng miteinander verwandt (persönliche Kommunikation, Jörg Schulze und Isabelle Astner), wogegen auf der Ebene der Primärstruktur keine signifikante Verwandtschaft besteht. Hier liegt der Gedanke nahe, dass sich beide Enzyme in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym entwickelt haben.

Bei der nun folgenden Umsetzung handelt es sich folglich um den ersten universellen Reaktionsschritt der Tetrapyrrolbiosynthese. Katalysiert durch die Porphobilinogensynthase werden in einer Knorr-Reaktion zwei Moleküle ALA zum Monopyrrol Porphobilinogen (PBG) verknüpft, unter Freisetzung zweier Wassermoleküle (**Abb. 3**). Bei dem darauf folgenden Kondensationsreaktion wird aus vier Porphobilinogenmoleküle durch das Enzym Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) das erste, offenkettige Tetrapyrrolmolekül, Preuroporphyrinogen III (Preuro'gen) gebildet¹². Vier Molekülen Ammoniak (NH₃) werden dabei freigesetzt. Preuroporphyrinogen III wird anschließend in einer ungewöhnlichen Reaktion durch die Uroporphyrinogen-Synthase in das zirkuläre Uroporphyrinogen III (Uro'gen III) umgesetzt. Ring D wird invertiert unter Beteiligung eines spirozyklischen Pyrroleninzwischenproduktes¹³. Dieser Schritt hat besondere Bedeutung, da das Gesamtmolekül durch die Inversion des Pyrrolrings D chiral wird. Dies ist die Grundvoraussetzung für gezielte Erkennung von Teilstrukturen des Tetrapyrrolgerüsts durch die nachfolgenden Enzyme. Nach dieser Umwandlung verzweigt sich die Tetrapyrrolbiosynthese zum ersten Mal, in einen Syntheseweg, in dem über Precorrin-2 Corrinoide (Vitamin B₁₂) Coenzym F₄₃₀, Sirohäm und Häm *d*₁ gebildet (**Abb. 1 – 3**) werden und einen Weg von Uro'gen III zu Protoporphyrin IX, der drei Schritte umfaßt. Es handelt sich bei diesen drei Umsetzungen um zwei aufeinander folgende Decarboxylierungsschritte (zu Coproporphyrinogen III¹⁴ und Protoporphyrinogen IX^{15; 16; 17}) sowie die abschließende 6-Elektronen-Oxidation zu Protoporphyrin IX bei der das aromatische System auf den gesamten Makrozyklus erweitert wird¹⁸. Von Protoporphyrin IX leiten sich alle weiteren Häme, Chlorophylle und Bacteriochlorophylle ab. Durch Metallochelatasen wird entweder Fe²⁺ (Häme), oder Mg²⁺ (Chlorophylle) in das Zentrum des Porphyrinringes inseriert. Abschließend folgt noch eine Reihe von Modifikationen, die die Moleküle (Häme oder Chlorophylle) für ihre jeweilige Aufgabe optimieren.

2.2.2 Regulation in der Tetrapyrrolbiosynthese

Erhöhte Mengen an freien Porphyrinen im Gewebe sind zytotoxisch für Organismen. Die Moleküle werden durch Licht leicht angeregt und erzeugen reaktiven Singulett-Sauerstoff. Dieses Wirkprinzip wird in der Medizin auf der Basis natürlicher, sowie synthetischer Tetrapyrrole zur Bekämpfung von Tumoren angewandt. Tetrapyrrole werden in Tumorgeweben angereichert und das Gewebe dann durch Bestrahlung zerstört. Um entsprechenden Effekten vorzubeugen unterliegt die natürliche Tetrapyrrolbiosynthese einer strikten Regulation. Die Regulation der Hämbiosynthese erfolgt auf der Ebene der Transkription, der Translation, durch posttranslationale Regulation, sowie durch Modulation der Enzymaktivitäten. Nach heutigem Kenntnistand stellt die Synthese von ALA in fast allen Organismen den ersten Regulationspunkt dar. Verschiedene Prinzipien sind hierfür beschrieben worden. So werden auf posttranslationaler Ebene sowohl die menschliche ALAS¹⁹ als auch die pflanzliche und die bakterielle GluTR durch Häm inhibiert (feedback-inhibition,^{9; 20}). In *Salmonella thyphimurium* erfolgt die Regulation unter anderem über die Variation der Halbwertszeit der GluTR durch die Steuerung des proteolytischen Abbaus des Enzyms^{21; 22}. In *P. aeruginosa*, *E. coli* und *B. subtilis* sind die beteiligten Transkriptionsfaktoren, Reize und Effektoren detailliert beschrieben worden²³. Ein weiterer Regulationspunkt findet in Bakterien auf der Ebene von HemF/HemN statt^{23; 24; 25; 26}. Für andere Organismen sind eine Reihe anderer Effektoren und Regulationsmechanismen beschrieben worden^{27; 28}. Auch die komplexe, vielschrittige Biosynthese von Vitamin B₁₂ unterliegt einer Regulation, hier sind Regulationspunkte und Mechanismen aber erst teilweise verstanden²⁹.

2.2.3 Krankheiten in Verbindung mit der Hämbiosynthese

Fehlfunktionen der verschiedenen Proteine der Hämbiosynthese beim Menschen führen zu einer Reihe von Krankheiten, den sogenannten Porphyrien³⁰. Sie sind im Allgemeinen auf eine erniedrigte Aktivität eines der acht beteiligten Enzyme zurückzuführen, aufgrund einer verringerten Expression des zugehörigen Gens oder durch das Auftreten von Mutationen in diesen Genen. Ein Totalausfall eines der acht Enzyme ist hingegen nicht mit dem Leben vereinbar. Porphyrien manifestieren sich meist als erhöhten Prophyrimengen in Blut, Urin und Kot. Zu den mit den Krankheiten verbundenen Komplikationen gehören Unterleibsschmerzen und eine erhöhte Photosensitivität der Haut, die zu leichten bis schweren Gewebsschäden

und zur Erblindung führen kann. In seltenen Fällen kann auch die Leber irreversibel geschädigt werden³⁰.

Tab. 1: Krankheiten die mit Fehlfunktionen der Enzyme der humanen Hämbiosynthese verknüpft sind.

Enzyme	Metaboliten	Porphyrien
	Glycin + Succinyl-CoA	
ALAS	↓	X-Chromosom-gebundene sideroblastische Anämie
	5-Aminolävulinsäure	
PBGS	↓	Doss Porphyrie
	Porphobilinogen	
PBGD	↓	Akute intermittierende Porphyrie
	Preuroporphyrinogen	
Uro'gen-Synthase	↓	Morbus Günther
	Uroporphyrinogen	
Uro'gen-Decarboxylase	↓	<i>Porphyria cutanea tarda</i>
	Coproporphyrinogen	
Copro'gen-Oxidase	↓	Vererbliche Coproporphyrie
	Protoporphyrinogen	
Proto'gen-Oxidase	↓	<i>Porphyria variegata</i>
	Protoporphyrin	
Ferrochelatase	↓	Erythropoetrische Protoporphyrie
	Häm	

2.2.4 Herbizide und Tetrapyrrolbiosynthese

Normalerweise ist die Bildung von Protoporphyrin IX direkt an die Insertion von Fe^{2+} gekoppelt, so dass Protoporphyrinogen IX direkt über Protoporphyrin IX zu Häm umgewandelt wird. Lichtabhängige, peroxidierende Herbizide wie das Acifluoren hemmen die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO)^{18; 31}. Die Inhibition der PPO führt jedoch zu einer Akkumulation von Protoporphyrinogen IX im Gewebe. Dieses Protoporphyrinogen wird dann durch die nicht-enzymatische Oxidation mit Sauerstoff zu Protoporphyrin IX umgesetzt. Durch die Entkopplung dieses Reaktionsschrittes von der enzymatisch gesteuerten Hämsynthese entfällt die Feed-back-Inhibition des kompletten Biosynthesewegs durch das Häm. In der Folge wird Protoporphyrin IX unkontrolliert akkumuliert, was aufgrund der Phototoxizität dieser Verbindung zu Gewebeschäden führt.

2.3 Porphobilinogensynthesen

2.3.1 Allgemeines

Wie bereits beschrieben katalysiert die Porphobilinogensynthase (PBGS, EC 4.2.1.24, auch 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase, ALAD) den ersten allgemeinen Schritt der Tetrapyrrolbiosynthese, die asymmetrische Kondensation von 2 Molekülen ALA zu PBG unter Freisetzung von zwei Molekülen Wasser (**Abb. 3 und 4**). Mit der Bildung von PBG wird zum ersten Mal ein Grundgerüst mit aromatischem Charakter gebildet. Die spätere Ausweitung dieser Aromatizität auf das gesamte Ringsystem der Tetrapyrrole stellt eine Grundvoraussetzung für die Funktion von Hämen und Chlorophyllen dar. Des Weiteren bildet das planare Ringgerüst die Voraussetzung für die später einzuführende Chiralität der Tetrapyrrole.

Die Porphobilinogensynthase muß bei der Substraterkennung und -bindung zwei identische Moleküle unterschiedlich behandeln und bei der Katalyse eine definierte asymmetrische Kondensation beider sicherstellen ². Je nachdem, aus welchem der ALA-Moleküle der Acetat- bzw. der Propionatrest des Pyrrolrings hervorgeht, unterscheidet man die Seiten im Produktmolekül als die A-Seite (A-side) und die P-Seite (P-side) (**Abb. 4**).

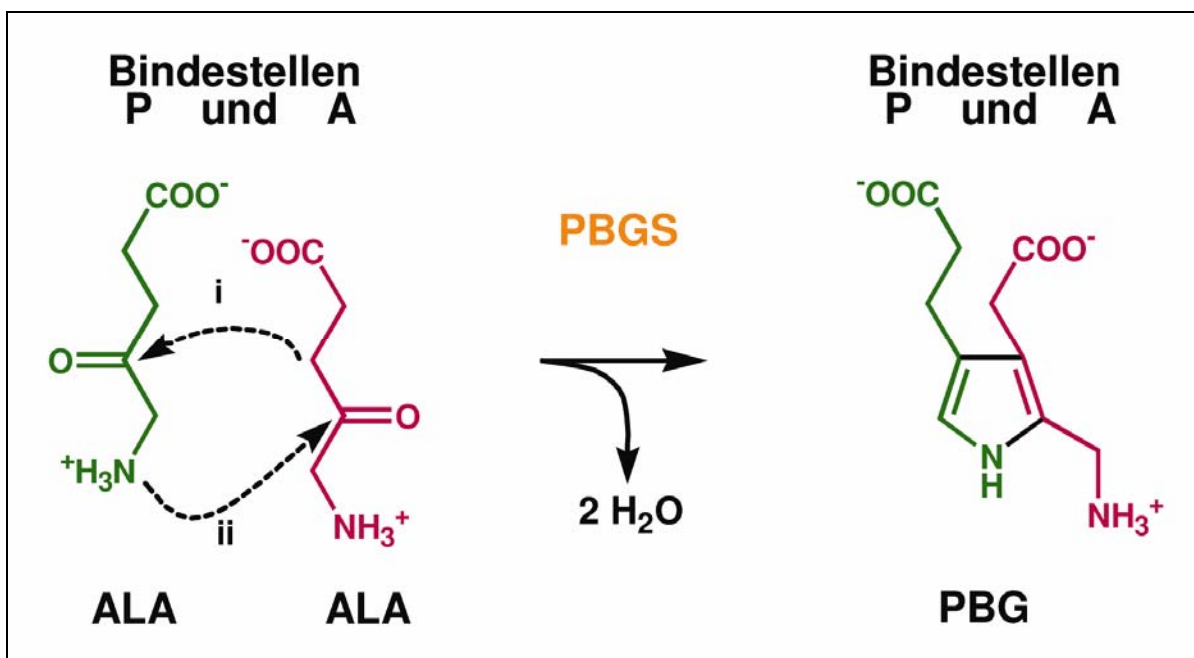


Abb. 4: Kondensationsreaktion von 2 Molekülen 5-Aminolävulinsäure (ALA) zu Porphobilinogen (PBG), katalysiert von Porphobilinogensynthase PBGS. Benennung der Substratbindestellen erfolgt nach den entstehenden Seitenketten im Produkt. A: Acetatseitenkette, P: Propionatseitenkette.

Analog werden die beiden Bindungsstellen am Enzym für die beiden ALA-Moleküle unterschieden in die A-Stelle (A-site) und die P-Stelle (P-site). Für die durch die PBGS katalysierte

Reaktion werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Sie unterscheiden sich in der Reihenfolge der Bildung der C-C - bzw. C-N – Bindungen des Pyrrols PBG (**Abb. 4**). Die beiden Mechanismen werden klassifiziert in den Jordan-I-Mechanismus mit der Aldolkondensation (C-C-Verknüpfung) als erstem Teilschritt und den Jordan-II-Mechanismus mit der Schiff-Basen-Bildung (C-N-Verknüpfung) als erstem Teilschritt³².

Trotz damals dreier veröffentlichter Kristallstrukturen des Enzyms und vielfältigster kinetischer Untersuchungen^{32; 33; 34; 35; 36; 37; 38}, konnte bis zum Beginn dieser Doktorarbeit noch nicht hinreichend geklärt werden, welchem der beiden Mechanismen die Reaktion folgt. Einzig die Bildung der initialen Schiff-Base und die Stereochemie der letzten Deprotonierung waren damals gesichert.

2.3.2 Molekulare Struktur der Porphobilinogensynthase

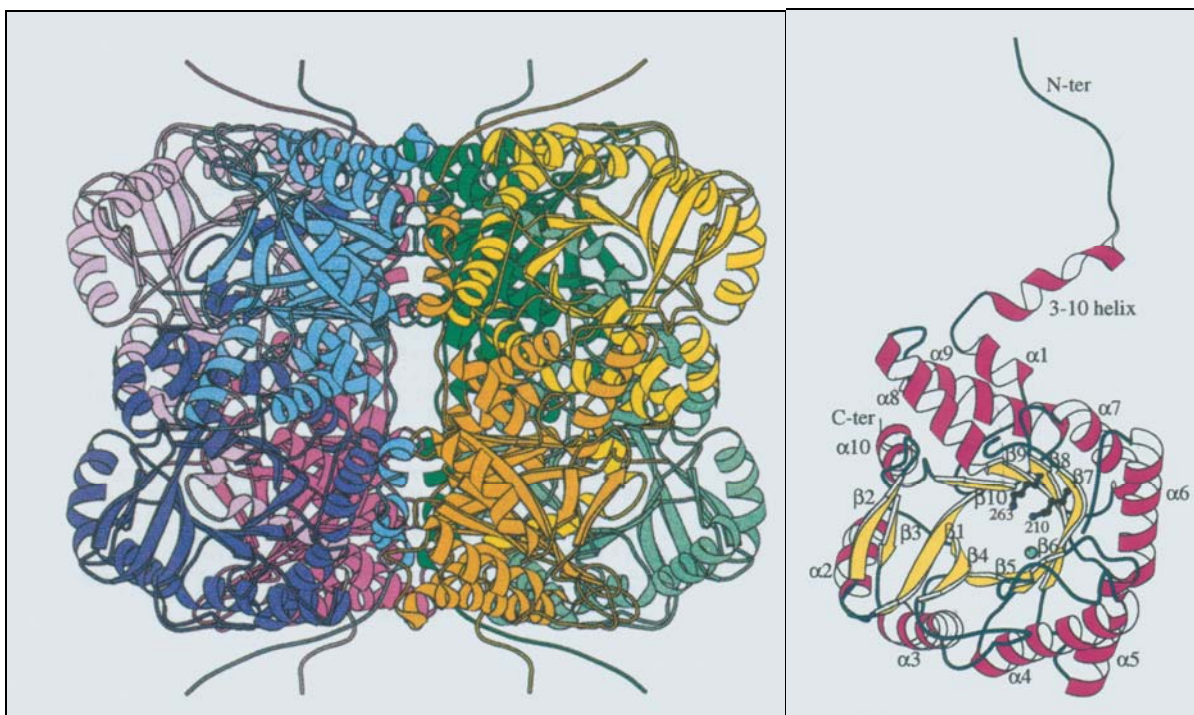


Abb. 5: Bändermodelle der ersten veröffentlichten Struktur einer PBGS (aus Hefe). Die linke Abbildung zeigt das Oktamer, von der Seite betrachtet, jedes Monomer in einer anderen Farbe. Im gelben Monomer sieht man entlang des inneren Kanals des $(\beta\alpha)_8$ -barrels. Rechts ist das Monomer mit dem deutlich erkennbaren Arm, den beiden Lysinen im aktiven Zentrums und dem Zn^{2+} -Ion (grün) in der Metall-Bindestelle B gezeigt³³.

Alle bis dato aufgeklärten PBGS-Kristallstrukturen zeigten eine oktamere Oligomerisierung des Enzyms, aufgebaut aus vier Dimeren in einer P4-Symmetrie (**Abb. 4**)^{32; 33; 35}. Das Monomer besteht aus einem $(\beta\alpha)_8$ -barrel³⁹, das sich aus einem achtsträngigen β -Faltblatt umgeben von acht α -Helices aufbaut, wobei je zwei β -Stränge durch eine α -Helix miteinander ver-

bunden sind. Innerhalb des Oktamers dominieren die Kontakte zwischen den Monomeren eines Dimers, vermittelt durch die jeweilige N-terminale Region eines Monomers, dem sogenannten Arm (ca. 30 AS). Das lösungsmittlexponierte aktive Zentrum jedes Monomers liegt in einer Tasche im C-terminalen Bereich des $(\beta\alpha)_8$ -barrels. Dort befinden sich zwei konservierte Lysinreste. Einer der beiden Lysinreste bildet die initiale Schiff-Base zum Substrat, der andere liegt parallel zum ersten. In den Kristallstrukturen der PBGS aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* (EcPBGS) und *Pseudomonas aeruginosa* (PaPBGS) liegt der kokristallisierte, substratanaloge Inhibitor Lävulinsäure gebunden an eines dieser Lysinen vor^{32; 35; 40} (**Abb. 6**).

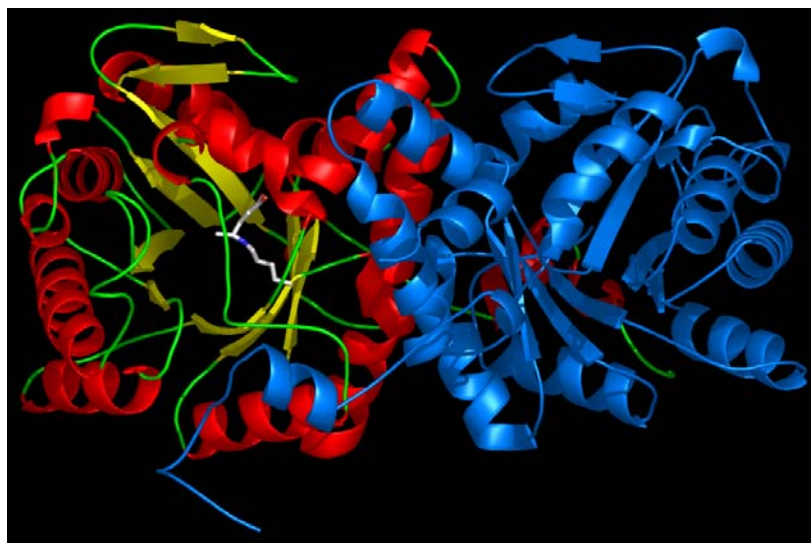


Abb. 6: Dimer der *Porphobilinogensynthase* aus *P. aeruginosa* (PaPBGS). Im linken Monomer ist der Inhibitor Lävulinsäure (LA), gebunden an den Rest K260 (beide in weiß) dargestellt.

Alle biochemisch charakterisierten PBGS-Proteine sind Metallo-Enzyme, die für ihre Aktivität Zn^{2+} , Mg^{2+} oder beide Kationen benötigen^{34; 35; 36; 41; 42; 43; 44}. Drei unterschiedliche Metallbindungsstellen sind durch biochemische und spektroskopische Untersuchungen, sowie durch die bekannten Kristallstrukturen identifiziert worden. **Tab. 2** zeigt eine Klassifizierung bekannter PBGS-Enzyme nach Frankenberg *et al.*³⁶, die diese drei Metallbindestellen berücksichtigt.

Tab. 2: Übersicht zur Metallabhängigkeit in der Emzymfamilie der PBGS.

Typ	Spezies	Zur vollständigen Aktivität notwendige Art und Anzahl von Metallionen pro Oktamer und Bindestelle			
		ZnA	ZnB	MgC	Gesamtzahl
I	<i>H. sapiens</i>	4 Zn	4 Zn	n. b.	8
?	<i>S. cerevisiae</i>	8 Zn	8 Zn	n. b.	16
II	<i>E. coli</i>	4 Zn	4 Zn	8 Mg	16
		oder n. b.	oder 8 Zn	oder 8 Mg	oder 16
III	<i>P. sativum</i>	4 Mg	4 Mg	8 Mg	16
		oder n. b.	oder 8 Mg	oder 8 Mg	oder 16
IV	<i>B. japonicum</i>	n. b.	4 Mg*	8 Mg	12
V	<i>P. aeruginosa</i>	n. b.	n. b.	4 Mg	4

Die Daten wurden aus Kristallstrukturen oder biochemischen Untersuchungen ermittelt. Unterschiedliche Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sind alternativ aufgeführt. Nennungen, die kursiv geschrieben sind, sind hypothetisch (aus der Aminosäuresequenz abgeleitet) um die ermittelte Gesamtzahl gebundener Ionen zu erklären. *H. sapiens* = *Homo sapiens*, *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*, *P. sativum* = *Pisum sativum*, *B. japonicum* = *Bradyrhizobium japonicum*, ZnA = Zinkbindestelle A, ZnB = Zinkbindestelle B, MgC = Magnesiumbindestelle C, n. b. = nicht besetzt, * in einer Bindestelle, die sowohl sequentiell als auch örtlich überlappt mit ZnB (umstritten).

In der Kristallstruktur der PBGS aus Hefe³³ sind die beiden Metallbindungsstellen A und B (ZnA, ZnB) jeweils mit Zn^{2+} besetzt. Die Koordinationsphäre von ZnA wird durch Cystein- und Histidinseitenketten, die Koordinationsphäre von ZnB nur durch Cysteinseitenketten gebildet. ZnA befindet sich in der Nähe des sogenannten „Deckels“, einer Schleife, die über dem aktiven Zentrum liegt und dieses im geordneten Zustand vom umgebenden Medium abschirmt. ZnB befindet sich am aktiven Zentrum. Seine Bedeutung für die Katalyse ist ebenfalls Gegenstand der Forschung. Daß diese Metallbindestelle durch drei Cysteinreste gebildet wird, spricht für eine strukturelle Funktion. Die Lokalisation am aktiven Zentrum und die Besetzung der vierten Koordinationsstelle des Zinkions mit einem Wassermolekül³³, lassen jedoch weitere Deutungen zu. So könnte das polarisierte Wasser leicht ein Proton abgeben und danach als Base wirken⁴⁵. Zusätzlich wurde vorgeschlagen, dass das Zinkion zur Polarisierung und damit Aktivierung des zweiten Substratmoleküls herangezogen werden könnte⁴⁵. Jedoch gibt es auch eine große Anzahl von PBGSen (z.B. *PaPBGS*), denen ZnB fehlt und die trotzdem die Bildung von PBG mit vergleichbaren Umsatzraten bewerkstelligen. Die Metallbindestelle C (MgC) tritt wie ZnA und ZnB nur in einer Untergruppe von PBGSen auf und niemals gemeinsam mit ZnA, jedoch teilweise gemeinsam mit ZnB (**Tab. 2**). In der *PaPBGS* werden Positionen der AS-Seitenketten, die in *Saccharomyces cerevisiae* PBGS (*ScPBGS*) ZnB bilden, von anderen Aminosäureresten, hauptsächlich Aspartatresten, besetzt³⁵. Daher war vor Kenntnis der Kristallstrukturen postuliert worden, dass sich in dieser Region im aktiven Zentrum eine Mg^{2+} -Bindungsstelle befinden müsste⁴⁶. Jedoch zeigte die Struktur der *PaPBGS*, dass diese Aminosäurereste in ein System aus Salz- und H-Brücken eingebunden

sind und Mg^{2+} -Ionen nur in der Metallbindestelle C gebunden werden³⁵. Die Existenz einer Metallbindestelle für Mg^{2+} -Ionen im aktiven Zentrum nicht-zinkbindender PBGSen ist weiterhin umstritten.

Neben der Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen ist für verschiedene PBGSen auch ein aktivierender Effekt durch monovalente Metallkationen beschrieben worden^{36; 44; 47}. Ob dieser Effekt auf einer allgemeinen Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur der PBGS durch einwertige Metallionen beruht, oder ob sie direkt an der Katalyse beteiligt sind, konnte bisher nicht geklärt werden.

2.3.3 Porphobilinogensynthase aus *P. aeruginosa*

Bei der Betrachtung der Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese aus *P. aeruginosa* in unserer Arbeitsgruppe geriet auch die Porphobilinogensynthase (PBGS) in den Focus der Untersuchungen. Es wurde festgestellt, dass sie keinen zentralen Regulationspunkt darstellt, allerdings zeigte sie eine interessante Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen^{34; 35; 36; 46}, denn im Gegensatz zum Enzym aus *E. coli* ist sie unabhängig von Zn^{2+} (da ihr sowohl ZnA als auch ZnB fehlt, wie sich später zeigte). Aus diesem Grund wurde die PBGS von Frau Dr. Frankenberg-Dinkel im Rahmen ihrer Doktorarbeit umfassend charakterisiert, hierbei wurde die Kristallstruktur des Enzyms mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. *PaPBGS* bildet als aktive Spezies ebenfalls ein Homooktamer, das als Tetramer von Dimeren aufgefasst werden kann. Vier Mg^{2+} -Ionen werden pro Oktamer in der allosterisch wirksamen Bindestelle MgC gebunden. Die Bindung des Metallions induziert eine Asymmetrie zwischen den Monomeren eines Dimers und reguliert auf diesem Weg die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum³⁵. Durch die Bindung des Metalls wird eine sonst vorhandene interne Salzbrücke unterdrückt; die freiwerdende saure Aminosäure trägt dann zur Stabilisierung der labilen Schleife (Deckel) über dem aktiven Zentrum bei, der dieses damit verschließt. Folgerichtig ist die Gesamtaktivität der *PaPBGS* stark abhängig von der Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen. In Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen fällt sie auf ca. 1% der optimalen Aktivität. Allerdings konnte durch die Kristallstruktur der *PaPBGS* und begleitenden kinetischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass das Enzym einen Katalysemechanismus benutzt, der unabhängig von der direkten Beteiligung zweiwertiger Metallionen ist, im Unterschied zu allen bis dahin analysierten PBGSen aus anderen Organismen³⁶. Durch die Kokristallisation eines Inhibitors (Lävulinsäure, LA) und die Lösung der zugehörigen Kristallstruktur der *PaPBGS* konnten die für die Substrater-

kennung wichtigen Aminosäurereste in der P-Stelle charakterisiert und darauf aufbauend die Bindestelle für das zweite Substratmolekül (A-Stelle) postuliert werden. Die Charakterisierung dieser zweiten Bindestelle war Thema der von mir in diesem Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit ⁴⁸. Es gelang die Kokristallisation von *Pa*PBGS mit dem Produkt PBG. Im Verein mit der Charakterisierung punktuell mutagenisierter PBGSen konnten dadurch die für die Substratbindung in der Bindestelle A essentiellen Aminosäurereste (D131, D139, K205, K229, R215 und Q233) eindeutig identifiziert werden.

2.4 Aufgabenstellung

Die umfassenden Charakterisierung der *Pa*PBGS und ihre gute Kristallisierbarkeit bildeten die Grundlage für die nun folgenden Fragestellungen der vorliegenden Doktorarbeit:

- Auf welche Weise katalysiert die PBGS die asymmetrische Kondensation der beiden ALA-Moleküle ? In welcher Reihenfolge werden dabei die beiden Bindungen (C-C-Bindung und C-N-Bindung) gebildet? Welche Aufgabe kommt dabei den monovalenten Kationen zu?
- Lässt sich der evolutionäre Übergang zwischen Zink bindenden und zinkunabhängigen Porphobilinogensynthasen *in vitro* nachstellen? Welche Auswirkungen hat ein solcher Übergang auf die katalytischen Eigenschaften der PBGS? Lässt sich dadurch die Funktion der Zinkbindestelle ZnB beschreiben?

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

<i>Atomabsorptionsspektroskopie:</i>	AAS 3100	Perkin Elmer
<i>Agarosegelelektrophorese:</i>	Agagel	Biometra
<i>Autoklav:</i>	LVSY 50/70	Zirbus
<i>Elektroporation:</i>	Gene Pulser II	Biorad
<i>FPLC:</i>	ÄKTApurifier	Amersham Biosciences
<i>French Press:</i>	French [®] Pressure Cell	Thermo Electron
<i>pH-Meßgerät:</i>	pH-Meter C 6840 B	Schott
<i>Geldokumentationsanlage:</i>	GelDoc	Biorad
<i>Konzentrationszellen:</i>	amicon 8010	Millipore
	amicon 8050	Millipore
<i>Photometer:</i>	Ultrospec 2000	Amersham Biosciences
<i>SDS-PAGE-Apparatur:</i>	Mini Protean III	BioRad
<i>Sterile Werkbank:</i>	Microflow	Nunc
<i>Thermocycler:</i>	Tpersonal	Biometra
<i>Thermomixer:</i>	Thermomixer 5350	Eppendorf
<i>Thermostaten:</i>	Lauda-Thermoboy C12	MGW Lauda
	Blockthermostat BT 200	Kleinfeld
<i>Ultraschallgerät:</i>	UW 2070	Bandelin
<i>Waagen:</i>	SBA 52	Scaltec
	BP61S	Mettler
<i>Wasserreinigung und -entsalzung:</i>	Synthesis A10	Millipore
<i>Zentrifugen:</i>	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
	Centrifuge 5403 C	Eppendorf
	Minispin	Eppendorf
	RC 5B Plus	Sorvall
	L7-65	Beckmann
	Speedvac Concentrator	Savant
Röntgengenerator	RIGAKU RU-H3R	Rigaku MSC
Röntgendetektor	RIGAKU R-axis IV ⁺⁺	Rigaku MSC

3.1.2 Chemikalien und Kits

CrystallScreen TM Kristallisationskit	Hampton Research
CrystallScreen II TM Kristallisationskit	Hampton Research
Wizard Screen I	Emerald Biosciences
Wizard Screen II	Emerald Biosciences
Additive Screen I TM	Hampton Research
Additive Screen II TM	Hampton Research

Detergent Screen™
 4-Dimethylaminobenzaldehyd
 Glutathion Agarose
 Perchlorsäure
 PreScission™ Protease
 Ribonuclease A
 Desoxyribonuclease II
 QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit
 Acrylamidstammlösung, Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)
 Standard für SDS-PAGE, Dalton Mark® VII-L
 Proteaseinhibitor, Complete Mini, EDTA-frei
 Wachstumsmedien

Hampton Research
 Sigma
 Amersham Biosciences
 Merck
 Amersham Biosciences
 Sigma
 Roth
 Stratagene
 Roth
 Sigma
 Roche
 Serva

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fluka, Gerbu, J.T.Baker, Merck, Roth und Sigma.

Der Inhibitor 5-Fluorlävulinsäure (5F-LA) wurde von Professor Dr. R. Neier, Universität Neuchâtel (CH) zur Verfügung gestellt.

3.2 Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Bakterien und Plasmide

Stamm	Beschreibung	Quelle
<u><i>Escherichia coli</i> Stamm</u>		
DH10 b	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ139Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>	Invitrogen, ⁴⁹
BL21(λDE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)	50
BL21CodonPlus™(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte[<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	50
XL1	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> _q ΔM15 Tn10 (Tet _r)]	50

Fortsetzung von **Tab. 3**: Übersicht über die verwendeten Bakterien und Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pGEX-6P-1	Expressionsvektor mit dem Gen der GST aus <i>Schistosoma japonicum</i> für N-terminale Proteinfusionen, sowie einer Erkennungssequenz für PreScission Protease, Amp ^R	Amersham Biosciences
pGEX-6P-1	Expressionsvektor mit dem Gen der GST aus <i>Schistosoma japonicum</i> für N-terminale Proteinfusionen, sowie einer Erkennungssequenz für PreScission Protease, Amp ^R	Amersham Biosciences
pGEX <i>hemB</i>	pGEX-6P-1-Derivat, kodiert N-terminale Fusion von GST mit PBGS (HemB) aus <i>P. aeruginosa</i> , Amp ^R	⁵¹
pGEX <i>hemBK205S</i>	Austausch des Triplets AAG in den Positionen 613-615 des <i>hemB</i> -Gens gegen TCG. Produziertes Protein trägt an Position 205 ein Serin statt Lysin	diese Arbeit, siehe 3.5.6
pGEX <i>hemBA129C</i> (Synonym: CXX)	Austausch des Triplets GCG in den Positionen 385-387 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Cystein statt Alanin.	⁵²
pGEX <i>hemBD131C</i> (Synonym: XCX)	Austausch des Triplets GAC in den Positionen 391-393 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 131 ein Cystein statt Aspartat.	⁵²
pGEX <i>hemBD139C</i> (Synonym: XXC)	Austausch des Triplets GAC in den Positionen 415-417 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 139 ein Cystein statt Aspartat.	⁵²
pGEX <i>hemBA129C/D131C</i> (Synonym: CCX)	Austausch des Triplets GCG in den Positionen 385-387 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC sowie des Triplets GAC in den Positionen 391-393 gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Cystein statt Alanin und an Position 131 ein Cystein statt Aspartat	⁵²
pGEX <i>hemBA129C/D139C</i> (Synonym: CXC)	Austausch des Triplets GCG in den Positionen 385-387 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC sowie des Triplets GAC in den Positionen 415-417 gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Cystein statt Alanin und an Position 139 ein Cystein statt Aspartat.	⁵²
pGEX <i>hemBD131C/D139C</i> (Synonym: XCC)	Austausch des Triplets GAC in den Positionen 391-393 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC sowie des Triplets GAC in den Positionen 415-417 gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 131 ein Cystein statt Aspartat und an Position 139 ein Cystein statt Aspartat.	⁵²
pGEX <i>hemBA129C/D131CD/139C</i> (Synonym: CCC)	Austausch des Triplets GCG in den Positionen 385-387 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC, des Triplets GAC in den Positionen 391-393, sowie des Triplets GAC in den Positionen 415-417 gegen TGC. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Cystein statt Alanin, an Positionen 131 und 139 je ein Cystein statt Aspartat.	⁵²

Fortsetzung von **Tab. 3**: Übersicht über die verwendeten Bakterien und Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pGEX- <i>hemBA129C/D131C/P132E/D139C</i> (Synonym: CCCE)	Austausch des Triplets GCG in den Positionen 385-387 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC, des Triplets GAC in den Positionen 391-393 sowie des Triplets GAC in den Positionen 415-417 gegen TGC und des Triplets CCG in den Positionen 391-393 gegen GAG. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Cystein statt Alanin, an Positionen 131 und 139 je ein Cystein statt Aspartat und an der Position 132 ein Glutamat statt Prolin	diese Arbeit, siehe 3.5.6
pGEX <i>hemBA129C/D131C/P132E/D139C/K229R</i> (Synonym: CCCER)	Austausch des Triplets GCG in den Positionen 385-387 des <i>hemB</i> -Gens gegen TGC, des Triplets GAC in den Positionen 391-393 sowie des Triplets GAC in den Positionen 415-417 gegen TGC, des Triplets CCG in den Positionen 391-393 gegen GAG, sowie des Triplets AAG gegen CGG in den Positionen 685-687. Produziertes Protein trägt an Position 129 ein Cystein statt Alanin, an Positionen 131 und 139 je ein Cystein statt Aspartat, an der Position 132 ein Glutamat statt Prolin und an der Position 229 ein Arginin statt Lysin.	diese Arbeit, siehe 3.5.6

3.3 Kulturmedien und Medienzusätze

3.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde ausschließlich das Vollmedium Luria Bertani (LB) verwendet, wie bei Sambrook *et al.* ⁵³ beschrieben.

<i>LB-Medium</i>	Hefe-Extrakt	5,0	g/l
	Protease Peptone	10,0	g/l
	NaCl in Wasser	10,0	g/l

3.3.2 Zusätze

Von den Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol und von IPTG wurden jeweils konzentrierte Stammlösungen angesetzt, die sterilfiltriert und jeweils unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium zugesetzt wurden. Ampicillin wurde auf die Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt, Chloramphenicol auf 34 µg/ml und IPTG auf die Endkonzentration von 1 mM.

Für Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar zum in **3.3.1** beschriebenen LB-Medium gegeben.

<i>Ampicillin-Stammlösung</i>	Ampicillin in Wasser	100,0	mg/ml
<i>Chloramphenicol-Stammlösung</i>	Chloramphenicol in Ethanol	34,0	mg/ml
<i>IPTG-Stammlösung</i>	IPTG in Wasser	1,0	M
<i>Agar-Zusatz</i>	Agar-Agar	15,0	g/l

3.4 Mikrobiologische Techniken

3.4.1 Sterilisation

Alle Medien und Puffer wurden bei 121 °C für 20 min dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen und Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße des Filters war 0,2 µm).

3.4.2 Wachstumsbedingungen

Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in Reagenzgläsern kultiviert. Aerobe Bakterienkulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm im Schikane-Kolben kultiviert. Inkubationszeiten bis zur Induktion mittels IPTG wurden abhängig von der Zelldichte variiert.

3.4.3 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der OD bei 578 nm im Photometer bestimmt, bei Zelldichten mit einer $OD_{578} \geq 1$ wurde eine 1:10-Verdünnung vermessen. Eine OD_{578} von 1 entspricht hierbei einer Zellzahl von ca. $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml.

3.5 Molekularbiologische Techniken

3.5.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

E. coli-Zellen (DH10b, BL21(λ DE3) und BL21CodonPlus™(DE3)-RIL) wurden unter aeroben Bedingungen in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0.6 angezogen und dann bei 8'000 rpm für 10 min zentrifugiert (Rotor: GSA). Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 40 ml dampfsterilisiertem, deionisiertem H₂O resuspendiert, in ein 50 ml Sarsted-Röhrchen überführt und nochmals für 5 min bei 5'000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die letzten drei Schritte wurden noch einmal wiederholt. Das Sediment wurde in steriler 10 %-iger Glycerinlösung in Wasser resuspendiert und für 5 min bei 5'000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Bakteriensediment wurde in einem Volumenteil, bezogen auf das Sedimentvolumen, 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 40 µl portioniert und bei –80 °C eingefroren.

3.5.2 Transformation von Bakterien

E. coli-Zellen wurden mittels Elektroporation oder CaCl₂-Methode transformiert. Die Elektroporation wurde durchgeführt wie bei Dower *et al.*⁵⁴ beschrieben. Die Zellen wurden dazu mit 1 – 2 µl DNA-Lösung (0.1 – 1 µg/µl) versetzt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. In einem Gene Pulser™ wurden sie durch einen kurzen starken Spannungsimpuls für die DNA permeabel gemacht.

Am Gene Pulser™ wurden folgende Einstellungen gewählt:

Kapazität	25,0	µF
Spannung	2,5	kV
Widerstand	200,0	Ω

Die Dauer des Impulses lag zwischen 10 und 40 ms.

Die Transformation per CaCl₂-Methode wurde nach Vorschrift des Herstellers des Site-directed-Mutagenesis-Kits (Stratagene) mit speziellen superkompetenten Zellen (*Epicurian coli* XL1-Blue), die im Kit enthalten waren, durchgeführt.

Man vereinigte und vermischte vorsichtig 50 µl der Zelllösung mit 1 µl DNA-Lösung (ca. 0,1 µg/µl) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß und lagerte die Lösung für 30 min auf Eis. Dann erhitze man die Lösungen für 45 sec bei 42 °C in einem vorgeheizten Heizblock und kühlte abschließend für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von jeweils 0,5 ml auf 42 °C temperiertem LB-Medium wurden die Zelllösungen für 1 h bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Aus den beiden Transformationsverfahren erhaltene Zelllösungen wurden je einmal 10 µl und einmal 100 µl auf LB-Agar-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

3.5.3 Plasmidpräparation

<i>Lösung 1:</i>	Tris-HCl (pH = 8.0)	25,0	mM
	EDTA	10,0	mM
	Glukose	50,0	mM
<i>Lösung 2:</i>	NaOH	200,0	mM
	SDS	1,0	% (w/v)
<i>Lösung 3:</i>	Kaliumacetat (pH = 4,8) mit Essigsäure titriert	3,0	mM
<i>Lösung 4:</i>	Tris-HCl (pH = 8.0)	25,0	mM
	EDTA	10,0	mM
	NaCl	150,0	mM
<i>Lösung 5:</i>	Phenol	50,0 %	(v/v)
	Chloroform	49,0 %	(v/v)
	3-Methyl-1-butanol	1,0 %	(v/v)
<i>RNase-Lösung:</i>	RNaseA	4,0	µg/µl

Es wurden Plasmid-Präparationen aus 40 ml Kulturansätzen durchgeführt (Midipräp). 36 ml Kulturlösung wurden in sterile SS34-Zentrifugenbecher gegeben, 5 min bei 8'000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment löste man in 750 µl Lösung 1 und inkubierte 2 min bei RT. Anschließend wurden 1,5 ml Lösung 2 hinzu gegeben, vorsichtig gemischt und erneut 2 min bei RT inkubiert. Zur Protein- und RNA-Fällung wurden 1,125 ml Lösung 3 zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die erhaltene Lösung wurde 20 min bei 18'000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in einen SS34-Zentrifugenbecher überführt. Zur Fällung der DNA wurden 2,5 ml Isopropanol zugegeben, die Lösungen gut vermischt, 5 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 18'000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wusch man mit 400 µl Lösung 4, setzte 4 µl RNase-

Lösung zu und inkubierte 30 min bei 37 °C. Nach dem Transfer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl Lösung 5 zugegeben, die Lösungen gut vermischt und 3 min bei 5500 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und die DNA durch Zusatz von 1 ml Ethanol gefällt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (RT) von 5 min wurde für 5 min bei 5500 g (13000 rpm in Minispinn-Zentrifuge von Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Es wurden 500 µl 70 % Ethanol zugegeben, gemischt und die Lösung für 5 min bei 5500 g zentrifugiert und das Sediment luftgetrocknet. Das getrocknete Sediment nahm man schließlich in 50 – 100 µl sterilem deion. H₂O auf. War die Reinheit der DNA zu niedrig (Bestimmung siehe unten), so wurden der DNA-Lösung 400 µl steriles deion. H₂O zugesetzt und die Schritte ab der Zugabe von 500 µl Lösung 5 wiederholt.

3.5.4 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurde mittels vergleichender Bestimmung der Absorption bei 260, 280 und 320 nm durch ein Ultrospec 2000-Photometer (Amersham Biosciences) ermittelt. Bei einem Faktor von 2.0 zwischen Abs₂₆₀ und Abs₂₈₀ kann die DNA als rein betrachtet werden ⁵⁵.

Abs₂₆₀ = 1.0 wurde einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt ⁵⁵.

3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

<i>TAE-Puffer</i>	Tris-Acetat (pH = 8.0)	40,0	mM
	EDTA	1,0	mM
<i>Agarosegel</i>	Agarose in TAE-Puffer	1,0	% (w/v)
<i>Probenpuffer</i>	Bromphenolblau	350,0	µM
	Xylen Cyanol FF	450,0	µM
	Orange G	0,25	% (w/v)
	Saccharose in Wasser	115,0	mM
<i>Ethidiumbromidlösung</i>	Ethidiumbromid in Wasser	0,1	% (w/v)
Längenstandard	GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)	0,5	µg/µl

Zur analytischen Trennung von DNA wurden 1%-ige Agarosegele (7,0 cm x 8,2 cm x 0,7 cm) verwendet. Hierbei werden DNA-Fragmente im elektrischen Feld proportional zum negativen Logarithmus ihrer Länge mittels „Submarine“-Technik aufgetrennt. Geräteeinstellungen waren 75 V, 120 mA und 60 min Laufdauer. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und kann mittels Fluoreszenz über eine Lichtquelle von $\lambda = 312$ nm detektiert werden. Nach 30 min Inkubation des Gel in Ethidiumbromid-Lösung (100-fache Verdünnung einer 1 %-igen Stammlösung) erfolgte die Längenbestimmung der DNA-Fragmente durch Vergleich mit dem Längenstandard.

3.5.6 Synthese von DNA-Primern

Die für die ortsgerichtete Mutagenese benötigten Primer wurden bei der MWG-Biotech AG bestellt.

Folgende Anforderungen mussten erfüllt werden:

- Primerlänge ≥ 25 Basen
- Mutationsstelle in der Mitte der Primer
- terminale Basen G oder C, GC-Gehalt ≥ 40 %
- Schmelzpunkt $T_m \geq 78$ °C:

$$T_m[^\circ\text{C}] = 81,5 + 0,41 \times (\%GC) - 675/N - \% \text{ ungepaarte Basen}$$

Folgende Primer wurden konstruiert:

K205Sfwd	5'-G GCC TAC TCG GCC TCG TAC GCC AGC GCC-3' (sense)
K205Srev	5'-GGC GCT GGC GTA CGA GGC CGA GTA GGC C-3' (antisense)
WT	5'-G GCC TAC TCG GCC AAG TAC GCC AGC GCC-3' (sense)
CCCEfwd	5'-GTG TGG CTC TGC GAG TTC ACC ACC CAT GGC-3' (sense)
CCCErev	5'-GCC ATG GGT GGT GAA CTC GCA GAG GCA CAC-3' (antisense)
CCC	5'-GTG TGC CTC TGC CCG TTC ACC ACC CAT GGC-3' (sense)
	Die Primer wurden auf das Gen angewendet, das für CCC ⁵² codiert.
CCCERfwd	5'-GGC AAG GGC AAC CGG GCC ACC TAC CAG-3' (sense)
CCCERrev	5'-CTG GTA GGT GGC CCGGT GCC CTT GCC-3' (antisense)
CCC	5'-GGC AAG GGC AAC AAG GCC ACC TAC CAG-3' (sense)
	Die Primer wurden auf das Gen angewendet, das für CCCE codiert.

Gegenüber der WT-Sequenz veränderte Basen sind fettgedruckt.

3.5.7 Einführung einer Punktmutation in ein Gen

Durch die punktuelle Änderung der DNA-Sequenz von Genen zu untersuchender rekombinanter Proteine können gezielt einzelne Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp-Protein (WT-Protein) ausgetauscht werden und so die Funktion dieser Aminosäurereste für Struktur, Substratbindung und Katalyse bestimmt werden. Für die ortsgerichtete punktuelle Mutation des *hemB*-Gens wurde das QuickChange™ site directed mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Es wurde dabei mittels PCR-Technik und unter Verwendung von Primern, die die gewünschten Basenaustausche tragen, das modifizierte Gen gebildet und anschließend amplifiziert, während der Gehalt an Ausgangsplasmid gleich blieb. Das Prinzip der Methode wird in **Abbildung 7** erläutert. Entscheidend für die Trennung des nicht modifizierten Ausgangsgens vom veränderten Mutantengen ist die differentielle Methylierung beider DNAs. Die Ausgangs-DNA war durch Amplifikation in *E. coli* DH10b zuvor methyliert worden. Die mutierte, in der PCR-Reaktion gebildete DNA blieb hingegen unmethyliert.

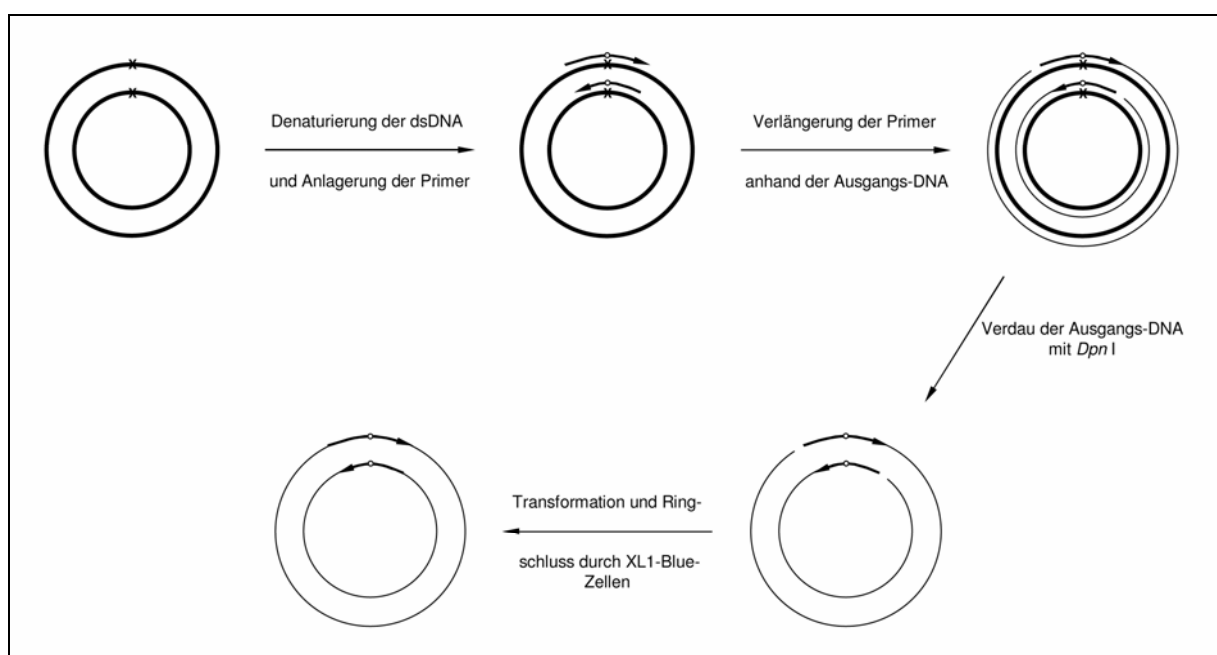


Abb. 7: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der QuickChange™ (aus Produktinformation der Firma Stratagene®, 1998), — Ausgangs-DNA, — mutiertes Plasmid, X Position der einzuführenden Mutation, —O→ Primer mit Mutation.

Nach der Amplifikation der modifizierten, nicht methylierten Plasmid-DNA wurde die teilweise methylierte Ausgangs-DNA durch *Dpn* I-Zugabe bei 37 °C verdaut. *Dpn* I verdaut nur methylierte DNA, so bleibt die neu PCR-synthetisierte DNA des Mutanten-Gens intakt. Abschließend wurde diese mittels CaCl_2 -Methode in im Kit enthaltene superkompetente Zellen *E. coli* XL1-Blue oder mittels Elektroporation in elektrokompente *E. coli* DH10b transfor-

miert. Dabei ligierte die *E. coli*-immanente DNA-Ligase die noch offenen Enden der circulären Amplifikate.

Einstellungen für die PCR, Volumina und Inkubationszeiten wurden strikt nach Vorgaben des Kit-Herstellers gewählt. Es wurden ausschließlich Lösungen des Kits verwendet.

3.5.8 DNA-Sequenzierung

Mutierte Gene der PBGS wurden mittels automatisierter DNA-Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin untersucht. Die DNA-Sequenzierung erfolgte als Auftragsarbeit durch MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland).

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Rekombinante Darstellung der Porphobilinogensynthase

3.6.1.1 Rekombinante Proteinsynthese

Puffer für chromatographische Proteinreinigung:

<i>Zellaufschlusspuffer</i>	NaCl	140,0	mM
	KCl	2,7	mM
	MgCl ₂	10,0	mM
	Na ₂ HPO ₄	10,0	mM
	KH ₂ PO ₄	1,8	mM
	(ZnCl ₂ nur bei cysteinhaltigen Mutanten)	1,0	mM
	RNase A	1 Spatelspitze auf 100 ml	
	DNase in Wasser	1 Spatelspitze auf 100 ml	
	Proteaseinhibitor	1 Tablette auf 100 ml	
	(pH = 7,4 titriert mit NaOH)		

<i>PBS-Puffer</i>	NaCl	140,0	mM
<i>(phosphate buffered saline)</i>	KCl	2,7	mM
	Na ₂ HPO ₄	10,0	mM
	KH ₂ PO ₄	1,8	mM
	(ZnCl ₂ bei cysteinhaltigen Mutanten)	1,0	mM
	(pH = 7,4 titriert mit NaOH)		

<i>Elutionspuffer</i>	NaCl	140,0	mM
	KCl	2,7	mM
	Na ₂ HPO ₄	10,0	mM
	KH ₂ PO ₄	1,8	mM
	Glutathion (pH = 7,4 titriert mit NaOH)	10,0	mM
<i>AIX-Puffer 1</i> (für Anionenaustauschchroma- tographie)	MES	50,0	mM
	MgCl ₂	10,0	mM
	(ZnCl ₂ bei cysteinhaltigen Mutanten)	1,0	mM
	(pH = 6,0 titriert mit NaOH)		
<i>AIX-Puffer 2</i> (für Anionenaustauschchroma- tographie)	MES	50,0	mM
	MgCl ₂	10,0	mM
	NaCl	1,0	M
	(ZnCl ₂ bei cysteinhaltigen Mutanten)	1,0	mM
	(pH = 6,0 titriert mit NaOH)		

Das zur Überexpression der rekombinanten Porphobilinogensynthase aus *P. aeruginosa* eingesetzte Plasmid pGEX*hemB* war bereits von Frau Dr. Frankenberg-Dinkel^{34; 35} konstruiert worden. Bedingt durch die Klonierung wurde die erste Base G des Startcodons (GTG) gegen C ausgetauscht, was zu einem Austausch der ersten AS von Valin gegen Leucin führte. Weiterhin wird die PBGS in diesem System als N-terminale Fusion mit GST exprimiert, so daß sich nach proteolytischer Spaltung an ihrem N-terminus 9 weitere AS befinden. Die Expression wird durch einen IPTG induzierbaren *tac*-Promotor kontrolliert, als Selektionsmarker enthält das Plasmid ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Exprimiert wurde in den proteasedefizienten *E. coli*-Stämmen BL21 (λ DE3) und BL21CodonPlus™(DE3)-RIL. Alle durch QuikChange™ erstellten Mutanten des *hemB* wurden ebenfalls in einem der beiden Systeme exprimiert.

Varianten von PBGS, bei denen ein oder mehrere Cysteinrest(e) eingeführt worden waren, wurden in der Gegenwart von 1 mM ZnCl₂ in den Puffern gereinigt, abgesehen vom Elutionspuffer für die Affinitätschromatographie, da zweiwertige Ionen beim Verdau mit PreScission Protease™ inhibierend wirken.

3.6.1.2 Zellkultivierung

Aus einer 250 ml Übernachtskultur wurden 10 x 500 ml dampfsterilisiertes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit jeweils 5 ml Kulturlösung angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 50 µl 1M IPTG-Lösung

(Endkonzentration 0,1 mM IPTG) die Expression der *hemB*-GST-Genfusion von *tac* induziert. Die Expression wurde über Nacht (ca. 20 h) bei 25 °C und 200 rpm fortgesetzt. Die Zelldichten erreichten dabei im Allgemeinen eine OD₅₇₈ von 6-8. Die Zellen wurden bei 5'000 rpm und 4°C für 10 min (Rotor: GSA) geerntet.

3.6.1.3 Zellaufschluß

Je 20 g Zellen wurden in 50 ml Zellaufschlußpuffer resuspendiert und entweder in drei Durchläufen in der French Press (Thermo Electron) oder durch Ultraschall (Bandelin Sonoplus, 0,3 sec Puls und 0,7 min Pause, 10 min, 70 % Amplitude, Kegelspitze MS 76) aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch verifiziert. Die erhaltene Suspension zentrifugierte man für 60 min bei 50'000 rpm und 4 °C (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 60) und filtrierte den Überstand durch ein Nylonfilternetz.

3.6.1.4 Erste Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose

Nach der Äquilibration der mit 10 ml Glutathion-Agarose gepackten XK-16/10-Säule (Amersham Biosciences) mit 5 Säulenvolumen PBS-Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde der filtrierte cytoplasmatische Extrakt mit gleicher Flußrate aufgetragen. Nach einem Spülschritt von 10 Säulenvolumen PBS-Puffer wurde das HemB-GST-Fusionsprotein mit Elutionspuffer eluiert. Die Elution wurde per SDS-PAGE und Spektroskopie verfolgt.

3.6.1.5 Protease-Verdau

Zur Spaltung des Fusionsproteins in GST und PBGS wurde die Proteinlösung mit 140 U PreScission Protease (Amersham Biosciences) je 20 mg Protein versetzt und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Der Verlauf des Verdaus wurde per SDS-PAGE verfolgt. Da die Protease durch zweiwertige Metallionen inhibiert wird, waren diese im Elutionspuffer nicht anwesend.

3.6.1.6 Konzentrierung

Die nach dem Proteaseverdau erhaltenen Proteinlösungen (ca. 50 ml) wurden in einer 50 ml-Rührzelle (Amicon) mit einer YM10-Membran (Amicon) bei 3×10^5 Pa auf jeweils 5 ml konzentriert.

3.6.1.7 Dialyse

Anschließend wurde die Proteinlösung dreimal je 2 h gegen je 500 ml PBS-Puffer dialysiert um Glutathion zu entfernen. Es wurden dazu Dialyseschläuche aus regenerierte Zellulose verwendet (Dialyseschlauch Visking, Typ 27/32, Ausschlussgrenze 14'000, Roth).

3.6.1.8 Zweite Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose

In diesem Schritt wurden abgetrennter GST-Tag, unverdautes Fusionsprotein und die PreScission™ Protease, ebenfalls eine Fusion mit GST, an das Affinitätsmaterial gebunden. Die abgespaltene PBGS war im Durchlauf auffindbar. Dazu wurde nach Äquilibration mit 5 Säulenvolumen PBS-Puffer die verdaute Proteinlösung mit 1 ml/min aufgetragen und der PBGS enthaltende Durchlauf aufgefangen. Abschließend regenerierte man die Säule mit Elutionspuffer, wodurch GST-Tag, ungeschnittenes Fusionsprotein und die PreScission Protease von der Matrix eluiert wurden. Beide Elutionsschritte wurden per SDS-PAGE und per Spektroskopie verfolgt.

3.6.1.9 Anionen-Austausch-Chromatographie

Die ca. 35 ml Proteinlösung, die die abgespaltene PBGS enthielten wurden zur abschließenden Reinigung einer Anionenaustauschchromatographie an einer starken Anionenaustauschmatrix (MonoQ™, Amersham Biosciences) unterzogen. Das Säulenmaterial wurde dazu mit 2 Säulenvolumina AIX-Puffer 2 und anschließend 10 Säulenvolumina AIX-Puffer 1 äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung ohne vorherige Dialyse direkt auf das Säulenmaterial aufgetragen und mit 10 Säulenvolumina AIX-Puffer 1 gewaschen. Zur Elution der Proteine

wurde zuerst im linearen Gradient zwischen 0 und 21 % AIX-Puffer 2 verteilt über 5 Säulenvolumina eluiert, gefolgt von einem Elutionschritt von 10 Säulenvolumina bei einem Verhältnis von 79 % AIX-Puffer 1 zu 21 % AIX-Puffer 2. Hierbei eluierten die Verunreinigungen. Reine PBGS eluierte im linearen Gradienten zwischen 21 % und 100 % AIX-Puffer 2 (15 Säulenvolumina).

3.6.1.10 Dialyse

Umpufferung in die für die jeweiligen Untersuchungsmethoden nötigen Puffer erfolgte durch Dialyse, wie oben beschrieben. Dabei wurde jeweils dreimal gegen das 100-fache der umzupuffernden Proteinlösung dialysiert, was einer Verdünnung der im Ausgangspuffer enthaltenen Kleinmoleküle um den Faktor 1'000'000 entspricht.

3.6.1.11 Konzentrierung

Um zur Kristallisation geeignete Proteinkonzentrationen von ca. 10 mg/ml zu erhalten, wurden Volumina < 10 ml in einer 10 ml-Rührzelle (Millipore) mit einer YM10-Membran (Millipore) bei 3×10^5 Pa auf das aus Ursprungskonzentration und Ursprungsvolumen berechnete Endvolumen konzentriert.

3.6.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der verschiedenen Lösungen wurde die A_{280} photometrisch bestimmt. Der molare Absorptionskoeffizient der PBGS beträgt ⁵⁶:

$$\varepsilon = 28'020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Daraus berechnet sich die Proteinmenge über das Lambert–Beer-Gesetz wie folgt:

$$c[\text{mg} / \text{ml}] = \frac{M_r[\text{g} / \text{Mol}] \cdot A_{280}}{\varepsilon[\text{Mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] d[\text{cm}]}$$

d = Schichtdicke der Küvette, [cm], (hier 1 cm)
 M_r = relative molekulare Masse
 ε = Absorptionskoeffizient, [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
 A_{280} = Absorption bei 280 nm

Da das berechnete Molekulargewicht der PBGS 37'832 Da pro Untereinheit beträgt, ergab sich die Faustformel, daß eine Absorption von 1.0 einem Proteingehalt von ca. 1,3502 mg/ml entsprach. Vor der Messung wurde das Photometer gegen den jeweiligen Puffer abgeglichen.

3.6.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<i>Acrylamidstammlösung</i>	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Roth	
<i>Sammelgelpuffer</i>	SDS	0,4 % (w/v)
	Tris-HCl (pH = 6,8)	0,5 M
	Lösungsmittel war Wasser	
<i>Trenngelpuffer</i>	SDS	0,4 % (w/v)
	Tris-HCl (pH = 8,8)	1,5 M
	Lösungsmittel war Wasser	
<i>APS-Lösung</i>	APS	10,0 % (w/v)
	Lösungsmittel war Wasser	
<i>Sammelgel</i> (für 4 Minigele)	Acryamid-Stammlösung	1,0 ml
	Sammelgelpuffer	1,25 ml
	deion. Wasser	2,75 ml
	TEMED	5,0 µl
	APS-Lösung	50,0 µl
<i>Trenngel</i> (4 Minigele)	Acryamid-Stammlösung	6,6 ml
	Trenngelpuffer	3,75 ml
	deion. Wasser	4,65 ml
	TEMED	15,0 µl
	APS-Lösung	150,0 µl
<i>Elektrophoresepuffer</i>	Glycin	190,0 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris-HCl (pH = 8,8)	25,0 mM
	Lösungsmittel war Wasser	

<i>Probenpuffer</i>	Glycerin	40,0 % (w/v)
	β -Mercaptoethanol	2,0 mM
	SDS	110,0 mM
	Bromphenolblau	3,0 mM
	Tris-HCl (pH = 6,8)	100,0 mM
<i>Färbelösung</i>	Essigsäure	10,0 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G-250	1,0 g/L
	Lösungsmittel war Wasser	
<i>Entfärbelösung</i>	Ethanol	30,0 % (v/v)
	Eisessig	10,0 % (v/v)
	Lösungsmittel war Wasser	
<i>Dalton Marker VII-L:</i>	α -Lactalbumin	14'200
	Trypsin Inhibitor	20'100
	Trypsinogen	24'000
	Carboanhydrase	29'000
	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	36'000
	Ovalbumin	45'000
	Rinderserumalbumin	67'000
<i>Entfärbelösung</i>	Ethanol	40,0 % (v/v)
	Eisessig	10,0 % (v/v)
	Lösungsmittel war Wasser	

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer molaren Masse aufgetrennt ⁵⁷. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine in einem großporigen Sammelgel bei pH = 8,8 fokussiert und dann bei pH = 6,8 im Sammelgel aufgetrennt, wodurch sich Bandenschärfe und Trennleistung deutlich erhöht ⁵⁸.

Es wurden 12 %-ige Gele (Bio Rad Mini Protean 2 System, 8,4 cm x 7,3 cm x 0,05 cm) verwendet. Die Proben enthielten 10 μ l Probenmaterial und 10 μ l Probenpuffer. Diese Lösungen wurden zur vollständigen Denaturierung 10 min auf 95 °C erhitzt und dann 30 sec bei 15'000 rpm zentrifugiert in einer Tischzentrifuge für kleine Kunststoffreagiergefäße. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 30 mA pro Gel durchgeführt (Dauer = 55 min). Färbelösung wurde im Mikrowellenofen zum Kochen erhitzt und die Gele darin für ca. 5 min geschwenkt. Anschließend wurden sie bis zur völligen Entfärbung der proteinfreien Gelmatrix in Entfärberlösung geschwenkt, digitalisiert und zur Konservierung zwischen zwei Cellophanfolien in einem Trockenrahmen getrocknet.

3.6.4 Bestimmung der Aktivität der Porphobilinogensynthase (PBGs): Test nach Ehrlich

<i>Ehrlich's Reagenz 1</i>	Eisessig	27,3 % (v/v)
	HCl, 37 %	72,7 % (v/v)
	DMBA	2,0 % (w/v)
<i>Ehrlich's Reagenz 2</i>	Eisessig	50,0 % (v/v)
	HClO ₄ , 60 %	50,0 % (v/v)
	DMBA	2,0 % (w/v)
<i>Stop-Lösung 1</i>	Trichloressigsäure	25,0 % (w/v)
<i>Stop-Lösung 2</i>	Trichloressigsäure	25,0 % (w/v)
	HgCl ₂	100,0 mM

Pyrrole und deren Derivate, wie z.B. PBG, lassen sich quantitativ colorimetrisch bestimmen durch eine Umsetzung mit DMBA im stark sauren Milieu⁵⁹. Im ersten Reaktionsschritt bildet sich aus DMBA und PBG ein rosa-farbenes Produkt E ($\lambda_{\max} = 555 \text{ nm}$). Es reagiert mit einem weiteren Molekül PBG zum farblosen Dipyrrolphenylmethan (siehe **Abb. 8**). Da die erste Reaktion jedoch wesentlich schneller abläuft als die zweite, kann man PBG quantitativ durch Absorptionsmessung im Photometer bei $\lambda = 555 \text{ nm}$ bestimmen.

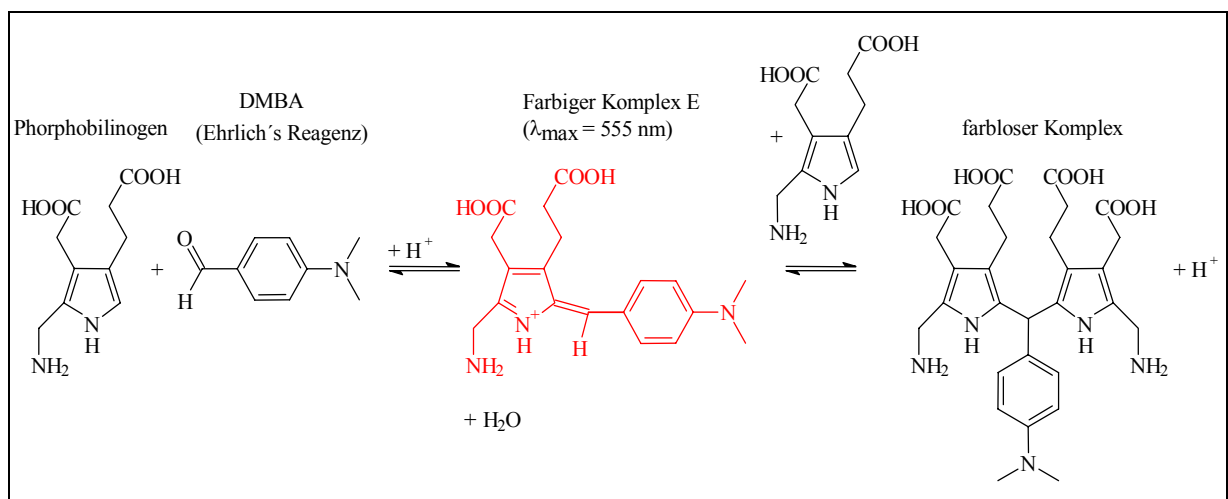


Abb. 8: Farbreaktion, Nachweis von PBG.

Die Berechnung der PBG-Konzentration erfolgt über das Lambert-Beer'sche Gesetz.

$$c = \frac{A}{d \cdot \varepsilon} \quad \varepsilon(\text{Komplex}) = 60'200 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

- c := PBG-Konzentration, [M],
 A := Absorption,
 d := Küvettenbreite, [cm], (= 1 cm),
 ε := molarer Extinktionskoeffizient des farbigen Komplexes, [M⁻¹ · cm⁻¹]

3.6.4.1 Inhibitionsversuche

Zum Vergleich der Potenz verschiedener Inhibitoren wurde das Verfahren zur Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}) verwendet⁶⁰. Die verwendeten Testbedingungen waren dabei 100 mM Bis-tris-propan ($pH = 8,5$), 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM ALA, zwischen 100 mM und 0,1 μM 5-FLA und 8 $\mu g/ml$ PBGS. PBGS und 5-FLA wurden für 45 min bei 37°C inkubiert bevor ALA-Lösung, die ebenfalls auf 37 °C vorgewärmt war, zugegeben wurde (Gesamtvolumen 400 μl). Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 400 μl Stopplösung 1 gestoppt. Nach dem Mischen der Lösungen wurden 600 μl abgenommen und mit 600 μl Ehrlich's Reagenz 1 vereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min (RT) wurde die Absorption der erhaltenen Lösung bei 555 nm ($\epsilon_{555}=60'200 M^{-1}$) bestimmt. Folgende Gleichung wurde mittels nichtlinearer Kurvenanpassung an die experimentell ermittelten Daten angepasst: $v_i/v_0 = 1/(1 + ([I]/IC_{50}))$, $[I]$ ist die Inhibitorkonzentration in μM und IC_{50} ist die Inhibitorkonzentration bei der die Aktivität auf 50% der Maximalaktivität gesenkt wird⁶⁰.

3.6.4.2 Relative Enzymaktivität von PBGS-Mutanten

Zur Bestimmung der relativen Enzymaktivität von Mutanten mit sehr geringer Aktivität wurde die lineare Zunahme von PBG über einen längeren Zeitraum ermittelt. Die verwendeten Pufferbedingungen richteten sich dabei nach den Anforderungen der jeweiligen PBGS-Variante (K260A, K205S). Durch die Zugabe von 6 ml ALA-Lösung (vortemperiert auf 37 °C) zu 6 ml Proteinlösung (37 °C) wurde die Reaktion gestartet. Nach je 3 min wurden 500 μl des Reaktionsgemischs entnommen und in 500 μl Stopplösung 1 oder 2 (für cysteinhaltige Mutanten) einpipettiert. 600 μl der erhaltenen Lösung wurden mit 600 μl Ehrlich's Reagenz 1 oder 2 gemischt und nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Absorption der erhaltenen Lösung bei 555 nm ($\epsilon_{555} = 60'200 M^{-1}$) bestimmt.

3.6.5.3 Bestimmung der pH-abhängigen Enzymaktivität der PBGS

Es wurden zwei verschiedene Verfahren für diese Messung angewandt. Im ersten Fall wurden die Werte k_{cat} und K_{Mapp} auf der Grundlage einer Michaelis-Menten-Kinetik im pH-Bereich

von 6,0 bis 10,0 in Schritten von 0,25 Einheiten bestimmt. Nominal entspricht die katalysierte Reaktion einer Bi-Mono-Kinetik, jedoch lassen sich die Daten mit der klassische Michaelis-Menten-Kinetik gut beschreiben. Die Michaeliskonstante K_M wird daher als K_{Mapp} (apparenter K_M -Wert) bezeichnet.

Je 200 μ l Proteinlösung (Proteinkonzentrationen: CCC: 40 μ g/ml, CCCE: 40 μ g/ml CCCER: 20 μ g/ml) in Reaktionspuffer (1 mM $MgCl_2$, 10 μ M $ZnCl_2$, 20 mM β -Mercaptoethanol und 100 mM 2-Amino-2-methyl-1-propanol [für pH 10,0-9,25], Bis-tris-propan [pH 9,0-6,75], Bis-tris [pH 6,5-6,0] oder Na-MES [pH 5,0-6,0]) wurden mit 200 μ l ALA Lösung (Konzentrationen: CCC: 0 - 8 mM, CCCE: 0 - 32 mM und CCCER: 0 - 96 mM ALA in Reaktionspuffer) vereinigt. Beide Lösungen waren zuvor auf 37 °C vortemperiert worden. Je nach Aktivität der Mutanten beim jeweiligen pH-Wert wurde 10 bis 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Vereinigung von 350 μ l dieser Lösung mit 350 μ l Stopplösung 2 in 1,5 ml Reaktionsgefäßen abgestoppt. Das erhaltene Gemisch wurde zur Abtrennung des ausgefallenen Adduktes zwischen Hg^{2+} und β -Mercaptoethanol für 5 min bei 5500 g (Minispinn, Eppendorf) abzentrifugiert. 450 μ l des Überstandes wurden zu 450 μ l Ehrlich's Reagenz 2 gegeben und kurz geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Absorption der erhaltenen Lösung bei 555 nm ($\epsilon_{555}=60 \cdot 200 \text{ M}^{-1}$) bestimmt (als Mittelwert aus zwei unabhängigen Proben). Die Bestimmung von k_{cat} und K_{Mapp} erfolgte durch Anpassung der Daten mit Hilfe nichtlinearer Kurvenanpassung („regression wizard“, Bestandteil von Sigmaplot 8 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) an folgende Gleichung für Michaelis-Menten-Kinetik: $v = k_{cat} \cdot [PBGs] \cdot [S] / (K_{Mapp} + [S])$; [PBGs]:= Konzentration des Proteins, [S] := Substratkonzentration. Der Quotient k_{cat}/K_{Mapp} wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. An die Datenpunkte wurden mittels nichtlinearer Kurvenanpassung („regression wizard“, Bestandteil von Sigmaplot 8 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) folgende Gleichung angenähert: $y = y_{max} / ((10^{-pH}/10^{-a}) + (10^{-b}/10^{-pH}) + 1)$; a entspricht pK_{a1} und b pK_{a2} .

In einem vereinfachten Verfahren wurde die pH-Abhängigkeit der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion in einer Zweipunktbestimmung ermittelt. Die Bildung von PBG wurde im pH-Bereich von 6,75 bis 9,0 in Dreifachbestimmung jeweils nach 10 und nach 30 min getestet. Je 200 μ l Proteinlösung (Proteinkonzentration: 30 μ g/ml) in Reaktionspuffer (1 mM $MgCl_2$ (CXC) bzw. 5 mM (CCX), 10 μ M $ZnCl_2$, 20 mM β -Mercaptoethanol und 100 mM Bis-tris-propan [pH 9,0-6,75]) wurden mit 200 μ l ALA Lösung (Konzentrationen: 48 mM) vereinigt. Die Reaktion wurde nach 10 bzw. 30 min durch die Vereinigung von 300 μ l Reaktionslösung

mit 300 µl Stopplösung 2 gestoppt. Die erhaltene Lösung wurde wie oben beschrieben weiterverarbeitet und der Mittelwert aus drei Werten errechnet.

3.6.5 Untersuchung der Bindung von Metallionen an Varianten von Porphobilinogensynthase mittels Equilibriumdialyse und Atomabsorptionsspektroskopie

<i>Dialysepuffer 1</i>	Tris-HCl	50,0	mM
	MgCl ₂	1,0	mM
	β-Mercaptoethanol	10,0	mM
<i>Dialysepuffer 2</i>	Tris-HCl	50,0	mM
	MgCl ₂	1,0	mM
	β-Mercaptoethanol	10,0	mM
	EDTA	10,0	mM
<i>Dialysepuffer 3</i>	Tris-HCl	50,0	mM
	MgCl ₂	1,0	mM
	β-Mercaptoethanol	10,0	mM
	ZnCl ₂	1,0	mM

1 ml der Proteinlösung (ca. 1 - 2 mg/ml) wurden in einem Dialyseknopf (Roth, Karlsruhe, Deutschland, Membran: Dialyseschlauch Visking, Typ 27/32, Ausschlussgrenze 14'000, Roth) für 2 h gegen 500 ml Dialysepuffer 2 gefolgt von drei Dialyseschritten (2 h) gegen je 500 ml Dialysepuffer 1 dialysiert. Abschließend wurde die Lösung über Nacht gegen 500 ml Dialysepuffer 1 dialysiert die zusätzlich 1 bis 1000 µM ZnCl₂ enthielten. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden mittels Gelpermeationschromatographie entsalzt, wozu zwei in Reihe geschaltete 5 ml HiTrap Desalting Säulen (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet wurden. Als Laufpuffer wurde Dialysepuffer 1 verwendet. Die Säulen wurden mit 5 Säulenvolumina gespült. Dann wurden 700 µl der Proteinlösung auf die Säulen aufgetragen und bei einer Flussrate von 4 ml/min eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Referenzläufe zeigten, dass die Fraktion 3 in allen Fällen die überwiegende Menge des Proteins enthielten, jedoch kein freies Zn²⁺. Diese Fraktion wurde mit 2 ml Dialysepuffer 1 verdünnt und davon zweimal 500 µl zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen. Die restliche Lösung wurde zur Bestimmung der Zinkionenkonzentration verwendet. Die Säule wurde nach der Elution mit einem Säulenvolumen 6 M Guanidiniumhydrochlorid von Proteinrückständen befreit, gefolgt von einer Reäquilibration mit 4 Säulenvolumina Dialysepuffer 1.

Zinkhaltige Lösungen wurden am Atomabsorptionsspektrometer 3100 (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) mit einer Zn-Lampe (Lumina™ Lamp, Perkin-Elmer) bei 15 mA bei einer Wellenlänge von 213,9 nm und einer Spaltbreite von 0,7 nm unter Verwendung einer Acetylen/Luft-Flamme analysiert. Zur Eichung wurden Referenzlösungen vermessen, die durch Verdünnung mit entsalztem Wasser aus einer kommerziellen Eichlösung (1.09953.Titrisol, Merck, Darmstadt) hergestellt wurden. Aus Proteinkonzentration und Zinkionenkonzentration wurde die Anzahl n der Zinkionen pro Monomer PBGS bestimmt und gegen die Konzentration der Zinkionen der jeweiligen zinkhaltigen Dialyselösung aufgetragen. Die Gleichung

$$n = n_0 + (n_1 * [Zn^{2+}]) / (K_D + [Zn^{2+}])$$

n = Anzahl der Zinkionen pro Monomer

n_0 = durch Dialyse mit EDTA nicht abtrennbare Menge an Zn^{2+}

n_1 = aufgenommene Menge an Zn^{2+} je Monomer

wurde mittels nichtlinearer Regression (regression wizard von Sigmaplot 8, Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) an die Daten angepasst.

3.7 Proteinkristallographie

3.7.1 Allgemeines

Die Röntgenstrukturanalyse ist seit mehr als zwei Jahrzehnten die meist eingesetzte Technik zur detaillierten Strukturaufklärung biologisch relevanter Makromoleküle. Sie erlaubt die Untersuchung einer enormen Bandbreite zu untersuchender Molekülgrößen (von Peptiden über Proteine und Ribosomen bis zu Viren) bei gleichzeitig technisch und finanziell überschaubarem Aufwand. Im Idealfall liefert die Röntgenstrukturanalyse Information bei atomarer Auflösung, anhand derer sich unter anderem Protein-Protein- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen detailgenau beschreiben lassen. Enzymstrukturen mit gebundener Reaktionsintermediaten oder -analoga erlauben direkte Einblicke in derer Katalysemechanismen.

3.7.2 Kristallisation von Proteinen

Maßgebliche Voraussetzungen für die röntgenkristallographische Strukturaufklärung eines Proteins sind Kristalle mit ausreichendem Brechungsvermögen für Röntgenstrahlen. Darü-

berhinaus ist eine geringe Mosaizität, d.h die submakroskopische Ordnung der Kristalle wichtiges Ziel bei ihrer Herstellung. Da Kristallisationsbedingungen nicht vorhersagbar sind, werden sie für jedes Protein empirisch ermittelt. Die Kristallisation von Proteinen kann als kontrollierte Fällung aus einer übersättigten, wässrigen Lösung angesehen werden. Dies wird durch den Zusatz sogenannter Fällungsmittel erreicht. Dabei können sowohl anorganische Salze, organische Lösungsmittel oder Polyethylenglykole sowie deren Kombination als Fällungsmittel dienen.

In dieser Arbeit wurde das Prinzip der Gasphasendiffusion im geschlossenen System zur Proteinkristallisation eingesetzt und zwar sowohl in der Ausführung des „hängenden“ sowie des „sitzenden“ Tropfens (**Abb. 9**, ⁶¹). Es wurde dabei eine definierte Lösung aus Fällungsmittel, Puffersubstanzen und Salzen im Reservoir vorgegeben, die mit gleichem Volumen Proteinlösung zum Kristallisationstropfen vermischt wurde. Die Reservoirlösung wurde hierbei verdünnt, wodurch ein Diffusionsgradient zwischen Tropfen und Reservoir resultierte, dessen Ausgleich zur Konzentrierung des Fällungsmittels sowie des Proteins im Tropfen führte. Bei ausreichender Übersättigung kam es zunächst zur spontanen Kristallkeimbildung und nachfolgend zum Kristallwachstum, das endete, wenn die Proteinkonzentration in Lösung unter die Grenze der Sättigung fiel.

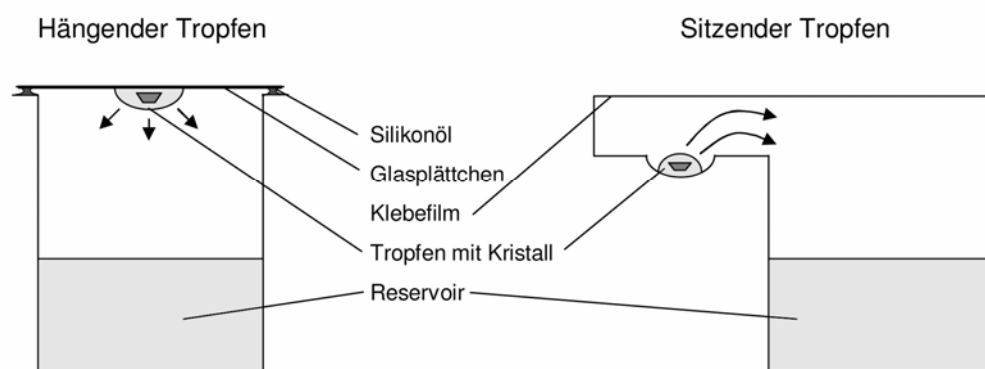


Abb. 9: Schematische Darstellung der Kristallisationsverfahren mit hängendem und sitzendem Tropfen

Kristallisationsansätze nach der Methode des sitzenden [bzw. hängenden] Tropfens wurden in Crystal Clear Strips (Douglas Instruments) [Limbro-Schalen (Hampton Research, Aliso Viejo)] angesetzt. Es wurden 100 µl [500 µl] Fällungsmittellösung im Reservoir vorgegeben. 5 µl [3 µl] dieser Pufferlösung wurden dann mit 5 µl [3 µl] einer gepufferten 10 mg/ml Proteinlösung in einer Mulde [auf einem Glasplättchen] zu dem Tropfen vereinigt. Ein transparenter Klebefilm [Silikonöl an der Kontaktstelle Reservoir/Glasplättchen] sorgt für Luftabschluss nach außen.

Tab. 4: Übersicht über die Kristallisations- und Kryoschutzbedingungen für alle Mutanten.

Mutante	Versuchsanordnung	Kristallisationsbedingungen	Kryobedingungen
PBGS D139N + 5F-LA	Sitzender Tropfen, CrystalClear strips, 100 µl Reservoirlösung, Tropfen: 3 µl Reservoirlösung + 3 µl Proteinlösung	<i>Reservoir:</i> 1 M Na/K-Tartrat, 0,2 M Li ₂ SO ₄ , 0,1 M CHES, pH 9,5 <i>Proteinlg.:</i> 12 mg/ml, 50 mM K-HEPES, pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 20 µM 5F-LA	30 % (v/v) Glycerin, 70 % Reservoirlösung
XXC	Hängender Tropfen, Limbro Schale, 500 µl Reservoirlösung, Tropfen: 5 µl Reservoirlg. + 5 µl Proteinlg.	<i>Reservoir:</i> 28,5 % (w/v) PEG-400, 100 mM Na-HEPES pH 7,5, 80 mM MgCl ₂ , 20 mM DTT <i>Proteinlg.:</i> 8,7 mg/ml Protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM ZnCl ₂ , 10 mM DTT	10 % (v/v) PEG 400 + 90 % Reservoirlösung
CCX	Hängender Tropfen, Limbro Schale, 500 µl Reservoirlösung, Tropfen: 5 µl Reservoirlg. + 5 µl Proteinlg.	<i>Reservoir:</i> 31,5 % (w/v) PEG 400, 100 mM Na-HEPES pH 7,5, 20 mM MgCl ₂ , 20 mM β-Mercaptoethanol <i>Proteinlg.:</i> 9,0 mg/ml Protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM ZnCl ₂ , 10 mM DTT	10 % (v/v) PEG 400 + 90 % Reservoirlösung
CXC	Hängender Tropfen, Limbro Schale, 500 µl Reservoirlösung, Tropfen: 5 µl Reservoirlg. + 5 µl Proteinlg.	<i>Reservoir:</i> 30,0 % (w/v) PEG 400, 100 mM Na-HEPES pH 8,5, 200 mM MgCl ₂ , 20 mM β-Mercaptoethanol <i>Proteinlg.:</i> 7,5 mg/ml Protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM ZnCl ₂ , 10 mM β-Mercaptoethanol	10 % (v/v) PEG 400 + 90 % (v/v) Reservoirlösung
XCC	Hängender Tropfen, Limbro Schale, 500 µl Reservoirlösung, Tropfen: 5 µl Reservoirlg. + 5 µl Proteinlg.	<i>Reservoir:</i> 30,0 % (w/v) PEG 400, 100 mM Na-HEPES pH 7,5, 40 mM MgCl ₂ , 20 mM β-Mercaptoethanol <i>Proteinlg.:</i> 9,0 mg/ml Protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM ZnCl ₂ , 10 mM β-Mercaptoethanol	10 % (v/v) PEG 400 + 90 % (v/v) Reservoirlösung
CCC	Sitzender Tropfen, 96er-Schalen (Nunc), 100 µl Reservoirlösung, Tropfen: 3µl Reservoirlösung + 3µl Proteinlösung	<i>Reservoir:</i> 1 M K/Na-Tartrat, 100 mM MES pH 6,0, 20mM β-Mercaptoethanol <i>Proteinlg.:</i> 7 mg/ml Protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM ZnCl ₂ , 10 mM DTT	20 % (v/v) PEG 400 + 80 % (v/v) Reservoirlösung
CCCE	Sitzender Tropfen, crystal clear strips, 100 µl Reservoirlösung, Tropfen: 3µl Reservoirlösung + 3µl Proteinlösung, Ansatz und Lagerung der Schalen unter anaerober Atmosphäre (Box)	<i>Reservoir:</i> 1 M Lithiumsulfat, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM Nickelchlorid <i>Proteinlg.:</i> 12 mg/ml protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ZnCl ₂ , 10 mM DTT	20 % (v/v) Glycerin + 80 % (v/v) Reservoirlösung
CCCER	Hängender Tropfen, Limbro Schale, 500 µl Reservoirlösung, Tropfen: 5 µl Reservoirlg. + 5 µl Proteinlg.	<i>Reservoir:</i> 30,0 % (w/v) PEG 400, 100 mM Na-HEPES pH 7,5, 80 mM MgCl ₂ , 20 mM DTT <i>Proteinlg.:</i> 10 mg/ml protein, 50 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 10 µM ZnCl ₂ , 10 mM DTT	15 % (v/v) PEG 400 + 85 % (v/v) Reservoirlösung

Geeignete Kristallisationsbedingungen wurden unter Verwendung multifaktorieller Kristallisation-Screening-Kits ermittelt. Hierbei handelt es sich um eine Vielzahl vorgefertigter Reser-

voirlösungen, die zuvor bereits erfolgreich bei der Kristallisation von Proteinen eingesetzt worden sind.

Verwendete Kits:

CrystallScreen™ Kristallisationskit	Hampton Research
CrystallScreen II™ Kristallisationskit	Hampton Research
Wizard Screen I	Emerald Biosciences
Wizard Screen II	Emerald Biosciences
Detergent Screen™	Hampton Research

Zur Kokristallisation von PBGS D139N mit 5F-LA wurde die Proteinlösung zunächst gegen 50 mM K-HEPES, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ dialysiert und anschließend auf 12 mg/ml konzentriert. Zu 990 µl dieser Lösung wurde 10 µl 2 mM 5F-LA im gleichen Puffer zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde im Kristallisationsexperiment als Proteinlösung eingesetzt.

3.7.3 Kryokristallographie

Proteinkristalle weisen einen Wassergehalt von 30-70 % (w/v) auf. Meist führt ein unkontrollierter Verlust von Wasser zur Zerstörung des Kristalls, zumindest aber seines Streuvermögens im Röntgenexperiment. Daher muss bei der Vorbereitung und dem eigentlichen Experiment verhindert werden, dass der Kristall austrocknet. Durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen entstehen in Proteinkristallen zudem freie Radikale, die bei Raumtemperatur durch Kettenreaktionen zur Schädigung des gesamten Kristalls führen. Bis in die neunziger Jahre hinein, wurden daher mehrere Kristalle zur Aufnahme eines kompletten Datensatzes benötigt. Beide beschriebenen Probleme werden durch Messungen bei Tieftemperaturen behoben, da sowohl das Austrocknen als auch die Ausbreitung der Strahlenschäden im Kristall verhindert werden⁶². Der Kristall, umgeben von Mutterlauge und durch Adhäsionskräfte in einer Nylon-schleife gehalten, wird auf 100 K tiefgekühlt und entweder im Stickstoffstrom oder in flüssigem Stickstoff gehandhabt. Da sich Wasser beim Einfrieren ausdehnt, zerstörte es, sofern kein Kryoschutzmittel in ausreichender Konzentration zugegeben wird, die Proteinkristalle. Das Kryoschutzmittel stellt beim Einfrieren einen Übergang der Lösung in einen glasartigen Zustand sicher. Dazu wurden zu 7 - 9 µl der entsprechenden Reservoirlösung 1 - 3 µl Kryoschutzmittel (PEG 400 oder Glycerin) zugegeben (**Tab. 4**). Diese Kryoschutzlösung muss

zwei Anforderungen erfüllen. Sie muss glasartig gefrieren und zudem darf der Austausch der Mutterlösung des Kristalls gegen diese Lösung nicht zu einem Verlust des Streuvermögens oder einer starken Erhöhung der Mosaizität des Kristalls führen. Beides wurde vorab durch Einfrieren der Flüssigkeit ohne bzw. mit kleinen/verwachsenen Kristallen aus demselben Tropfen des zu untersuchenden Kristalls ermittelt. Die Kristalle wurden mit Hilfe einer Ny-lonschleife aus dem Tropfen entnommen und in diese Kryolösung transferiert, für ca. 10 sec darin inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.7.4 Strukturanalyse

3.7.4.1 Aufbau von Kristallen

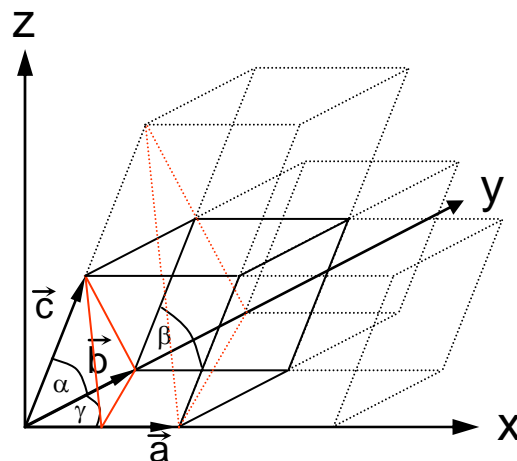


Abb. 10 Aufbau eines Kristalls aus seiner Elementarzelle, die definiert wird durch die Gittervektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} sowie die Winkel α , β und γ . In orange sind zwei Ebenen der Ebenenschar eingezeichnet die durch die Millerschen Indizes $h = 2$, $k = 1$ und $l = 1$ definiert wird, sie schneidet \vec{a} bei $\vec{a}/2$, \vec{b} bei $\vec{b}/1$ und \vec{c} bei $\vec{c}/1$.

Die kleinste Einheit, die durch wiederholte Aneinanderlagerung in alle drei Raumrichtungen einen Kristall ergibt, wird als Elementarzelle bezeichnet. Die Elementarzelle wird durch die drei Vektoren \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} und die durch diese Vektoren aufgespannten Winkel α , β , γ beschrieben (**Abb. 10**). Das Verhältnis dieser sechs Parameter zueinander definiert insgesamt sieben Kristallsysteme, die als kubisch, tetragonal, orthorhombisch, monoklin, hexagonal, trigonal und triklin bezeichnet werden. Die Kombination der Kristallsysteme mit drei so genannten Zentrierungen (Primitiv bzw. Flächen- und Innenzentrierung) ergeben 14 Bravais-Gitter. Die Molekülanordnung in der Elementarzelle, zum Teil durch die Bravais-Gitter festgelegt, kann durch Symmetrieelemente (Inversionen, Spiegelungen, Drehungen, und Translationen sowie

deren Kombinationen zu Drehspiegelachsen, Gleitspiegelebenen und Schraubenachsen) abstrahiert werden. Die möglichen Kombinationen der Symmetrieelemente beschreiben 32 Kristallklassen. Die Verknüpfung der 14 Bravaisgitter mit den 32 Kristallklassen ergeben 230 mögliche Raumgruppen.

Da Proteine jedoch aus chiralen Monomeren, den L-Aminosäuren aufgebaut sind, entfallen hier Symmetrien, die zu einer Umkehrung ihrer Händigkeit führen. Diese Symmetrieelemente schließen Spiegelungen, Inversionen, Drehspiegelachsen und Gleitspiegelebenen ein. Es verbleiben insgesamt nur 65 Raumgruppen für Proteinkristalle.

3.7.4.2 Röntgenbeugung

Das Phänomen der Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen lässt sich in guter Näherung durch das Bragg'sche Beugungsgesetz beschreiben. Hierbei wird angenommen, dass die Röntgenstrahlen an zueinander parallelen Ebenen im Kristall, den so genannten Netzebenen reflektiert werden. Eine Schar von Netzebenen wird durch die Variablen h , k und l , den Miller'schen Indizes, beschrieben. Die Millerschen Indizes geben an, in wieviel gleiche Teile die Gittervektoren a , b und c durch die Ebenen unterteilt werden (**Abb. 10**).

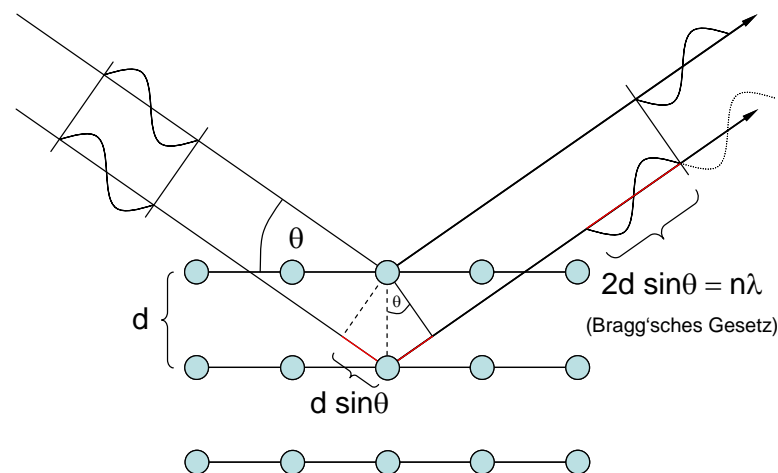


Abb. 11: Darstellung des Bragg'schen Beugungsgesetzes. Konstruktive Interferenz tritt nur auf, wenn der Röntgenstrahl unter dem Glanzwinkel θ einfällt bei dem das Bragg'sche Gesetz erfüllt ist. d : Abstand zwischen zwei Netzebenen, λ : Wellenlänge der eingesetzten Röntgenstrahlung.

Reflexe lassen sich nur in bestimmten Richtungen beobachten, in denen es zur konstruktiven Interferenz der reflektierten Strahlen kommt. Das Bragg'sche Gesetz verknüpft den Winkel unter dem man einen Reflex beobachtet mit dem Abstand d der Netzebenen sowie der verwendeten Wellenlänge:

$$2d_{hkl} \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

- d_{hkl} = Abstand zwischen den Netzebenen der Schar hkl
 n = ganze Zahl
 λ = Wellenlänge des Primärstrahls
 θ = Glanzwinkel unter dem der Primärstrahl auf die Netzebenenschar hkl fällt

Das Beugungsbild eines Kristalls lässt sich mathematisch darüber hinaus als Fourier-Transformation der Elektronendichte des Kristalls beschreiben. Jeder gebeugte Reflex steht dabei in einem definierten Verhältnis zu dem so genannten Strukturfaktor \vec{F}_{hkl} , einer Wellenfunktion mit definierter Wellenlänge, Amplitude und Phase.

$$\vec{F}_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) \cdot e^{2\pi i(hx + ky + lz)} dV$$

- h, k, l = Millersche Indizes
 \vec{F}_{hkl} = Strukturfaktor, der den Reflex mit den Millerschen Indizes hkl hervorrufen kann
 $\rho(x, y, z)$ = Elektronendichte innerhalb der Elementarzelle mit den fraktionellen Koordinaten x, y, z

Sind die Strukturfaktoren in Gänze bekannt, lässt sich die Fouriertransformation auch in umgekehrter Richtung anwenden. Sie wird dann als Fourier-Synthese bezeichnet.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\vec{F}_{hkl}| \cdot e^{i\alpha_{hkl}} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

- h, k, l = Millersche Indizes
 \vec{F}_{hkl} = Strukturfaktor durch die Millerschen Indizes hkl definiert
 α_{hkl} = Phase des Strukturfaktors F_{hkl}
 $\rho(x, y, z)$ = Elektronendichte am Ort mit den Koordinaten x, y, z

Durch die Fourier-Synthese kann die Elektronendichte der Elementarzelle berechnet werden. Erkennbare Strukturen der Elektronendichte erlauben die Modellierung der Peptidkette, und durch mathematische Anpassung an die Elektronendichte kann die atomare Struktur des Proteins aufgeklärt werden. Vorher gilt es jedoch das Problem zu lösen, dass nicht alle benötigten Parameter experimentell ermittelt werden können. Parameter, die sich ermitteln lassen, schließen die Amplitude des Strukturfaktors ein, die sich aus der Intensität des Reflexes ermitteln lassen ($|\vec{F}_{hkl}| \sim I_{hkl}^2$). Die Wellenlänge wird durch das Experiment vorgegeben. Die geometrischen Gesetzmäßigkeiten des Beugungsmusters erlauben es, die Raumgruppe und in der Folge die Millerschen Indizes h, k und l zu bestimmen. Bei dieser Aufzählung fehlt jedoch die Phase (α) des Strukturfaktors \vec{F}_{hkl} , die für dessen vollständige Beschreibung benötigt wird. Der Umstand, dass die Phase experimentell nicht direkt ermittelt werden kann, wird als das Phasenproblem bezeichnet.

Zur Lösung des Phasenproblems sind im letzten Jahrhundert verschiedene Verfahren entwickelt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden Strukturen von Varianten der PBGS aus *Pseudomonas aeruginosa* gelöst. Da sich strukturelle Unterschiede dieser Varianten im Vergleich zum bekannten WT-Protein auf begrenzte Bereiche beschränken (wenige mutierte Aminosäurereste und/oder gebundene Kofaktoren), stand ein gutes Modell zur Strukturlösung zur Verfügung. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Packung der Moleküle im Kristall der Varianten der des Wildtyps gleicht. Diese Isomorphie der Kristalle stellt einen Sonderfall dar, der eine komplizierte Strukturlösung überflüssig macht. Es konnten daher in guter Näherung die Phasen dieses Modells für die Berechnung einer ersten, gut interpretierbaren Elektronendichtekarte der neu zu lösenden Strukturen verwendet werden:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left| \vec{F}_{hkl}^{neu} \right| \cdot e^{i\alpha_{hkl}^{alt}} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

h, k, l = Millersche Indizes

\vec{F}_{hkl}^{neu} = Strukturfaktor des Reflexes hkl aus der neu zu lösenden Struktur

α_{hkl}^{alt} = Phase des Strukturfaktors F_{hkl} berechnet aus der Struktur der WT *P. aeruginosa* PBGS

$\rho(x, y, z)$ = Elektronendichte am Ort mit den Koordinaten x, y, z

In den nachfolgenden Zyklen der Verfeinerung wurden die Phasen dann durch das modifizierte Modell angepasst. Dieses Verfahren bezeichnet man als Differenz-Fourier-Synthese.

3.7.4.3 Datensammlung

Alle Datensätze wurden bei Tieftemperaturen (100 K) aufgezeichnet. Es wurde an der Heimquelle CuK α -Strahlung mit einer Wellenlänge von 1,5413 Å (RU-H3R Röntgengenerator, GBF Braunschweig) in Kombination mit einem Flächendetektor (Rigaku-MSR R-Axis IV⁺⁺) verwendet. Des weiteren wurde Synchrotronstrahlung bei einer Wellenlänge von 1,05 Å (Messstation BW6, DESY, Hamburg) zusammen mit einem CCD-Detektor (MARCCD von Marresearch GmbH) eingesetzt.

3.7.4.4 Bestimmung der Messstrategie

Die Messstrategie wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: das Streuvermögen des Kristalls, seine Mosaizität, seine Orientierung im Raum relativ zum experimentellen Achsensystem.

tem, sowie „mikroskopische“ Eigenschaften wie die Größe der Gitterkonstanten und die Raumgruppe. So gilt zum Beispiel, dass je höher die Kristallsymmetrie ist, desto weniger Reflexe gemessen werden müssen (kleinere Gesamtdrehung in φ). Die Mosaizität beeinflusst die Ausdehnung, die Gitterkonstanten den Abstand der Reflexe. Da Überlappungen von Reflexen zu vermeiden sind, richtet sich die Größe des Winkelinkrements $\Delta\varphi$, um den der Kristall während jeweils einer Aufnahme gedreht wird, daher nach diesen beiden Größen. Der Abstand zwischen Kristall und Detektor richtet sich vor allem nach dem Brechungsvermögen des Kristalls. Für jeden neuen Kristall wurden deshalb zu Beginn zwei Beugungsbilder bei $\varphi = 0^\circ$ und $\varphi = 90^\circ$ ($\Delta\varphi = 0,5$) aufgenommen und mit dem Programm DENZO⁶³ indiziert, um daraus die Raumgruppe, die Zellparameter und die Orientierung des Kristalls zu ermitteln. Aus den Parametern wurde mit Hilfe des Programms MOSFLM⁶⁴ die optimale Messstrategie für einen vollständigen, redundanten Datensatz ermittelt.

3.7.4.5 Datenauswertung und Datenreduktion

Zur Datenauswertung wurde das Programmpaket HKL⁶³ verwendet, das folgende Programme beinhaltet:

XDISPLAYF

XDISPLAYF wurde zur Reflexsuche verwendet, eine Voraussetzung für die Indizierung der beiden Testaufnahmen. Die Indizierung (Identifizierung der Raumgruppe, Elementarzelle und Kristallorientierung) wiederum wird benötigt um eine optimale Messstrategie zu ermitteln. XDISPLAYF wurde zudem zur visuellen Kontrolle der durch Denzo durchgeführten Indizierung und Verfeinerung verwendet.

DENZO

Anhand der ersten Aufnahmen eines Datensatzes wurden iterativ Parameter wie Reflexradius, Hintergrundradius, Profilmittlungs-Radius, Reflexpartialitäts- und -positionsfehler angepasst. Das Programm verfeinerte zudem experimentelle Parameter wie Kristall-Detektor-Abstand, Strahldivergenz des Primärstrahls, die Strahlposition auf dem Detektor, Detektorausrichtung, Mosaizität des Kristalls und die Parameter der Elementarzelle für jede Aufnahme, gefolgt von der Integration der Reflexe.

SCALEPACK

Ein Teil der Reflexe wird auf einer Aufnahme nur partiell gemessen. Sie müssen daher aus mehreren aufeinander folgenden Aufnahmen summiert werden was mit dem Programm SCALEPACK durchgeführt wird. Auch kann es im Laufe des Experiments zu leichten Schwankungen zum Beispiel der Intensität des Primärstrahls kommen, was direkt die Intensität der Reflexe beeinflusst. Zum relativen Vergleich werden daher symmetrieverwandte Reflexe herangezogen, die die gleiche Intensität aufweisen sollten, und mit ihrer Hilfe die Daten skaliert. Die ermittelte Redundanz gibt an wie häufig jeder Reflex vollständig gemessen wurde, eine mittlere Redundanz von mindestens 3 – 5 ist hierbei sinnvoll. Die Vollständigkeit gibt den Prozentsatz der gemessenen Reflexe an bezogen auf die Anzahl theoretisch messbarer Reflexe bei der gewählten Auflösung, wobei Werte > 98 % wünschenswert sind. Folgende Parameter die ebenfalls durch SCALEPACK kalkuliert werden, erlauben Aussagen über die Qualität des Kristalls und des Experiments:

$$R_{sym} = \frac{\sum_n |I_{hkl(n)} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_n |I_{hkl(n)}|}$$

h, k, l = Millersche Indizes

$I_{hkl(n)}$ = Intensität des n -ten zum Reflex hkl symmetrieäquivalenten Reflex

$\langle I_{hkl} \rangle$ = mittlere Intensität aller zum Reflex hkl symmetrieäquivalenten Reflexe

R_{sym} ist ein Maß für die Konsistenz der symmetrieverwandten Reflexe innerhalb eines Datensatzes. Ein niedriger Wert (15 % oder geringer) deutet auf eine ausreichende Datenkonsistenz. Bei der Schale der höchsten Auflösung gibt es keinen absoluten Richtwert, es wird jedoch häufig auf einen Wert von unter 45 % geachtet.

Das Verhältnis I/σ_I gibt die mittlere Größe der gemessenen Intensitäten relativ zum mittleren Fehler der Messwerte an. Ein höherer Wert deutet auf eine höhere statistische Signifikanz der Daten hin. Bei der Schale höchster Auflösung gilt ein Wert von 3,0 als konservativ aber verlässlich.

Eine einwandfreie Skalierung der Daten setzt voraus, dass die Messfehler für alle betrachteten Auflösungsschalen möglichst genau abgeschätzt werden. Als Maß für die Richtigkeit dieser Abschätzung zieht man die Verteilung der Werte für χ^2 heran, die über alle Auflösungsschalen nahe um einen Wert von 1,0 liegen sollten.

$$\chi^2 = \frac{\sum_n |I_{hkl(n)} - \langle I_{hkl} \rangle|^2}{\sum_n E^2 \frac{n}{n-1}}$$

h, k, l = Millersche Indizes

$I_{hkl(n)}$ = Intensität des n -ten zum Reflex hkl symmetrieäquivalenten Reflex

$\langle I_{hkl} \rangle$ = mittlere Intensität aller zum Reflex hkl symmetrieäquivalenten Reflexe

n = Anzahl aller Reflexe des Datensatzes oder der Auflösungsschale

E = Vermuteter Fehler

TRUNCATE

Umrechnung von Reflexintensitäten (I_{hkl}) in Strukturfaktoramplituden ($|F_{hkl}|$). Wie bereits erwähnt, ist das Quadrat der Intensitäten proportional zu den Strukturfaktoramplituden der Reflexe. Der Proportionalitätsfaktor und der Temperaturfaktor eines Datensatzes wurden mit Hilfe eines Wilson-Plots⁶⁵ berechnet.

3.7.4.6 Phasierung

Wie in Kapitel 3.7.4.2 Röntgenbeugung bereits beschrieben, erfolgte die Phasenbestimmung für alle Proteinstrukturen, die im Rahmen dieser Arbeit gelöst wurden, mit Hilfe der Differenz-Fourier-Synthese.

3.7.4.7 Modellbau und Verfeinerung

Um die Beeinflussung durch die Phasen aus dem Ursprungsmodell (model bias) zu minimieren, wurden zum Modelbau so genannte 2F_O-F_C-Karten verwendet, die wie folgt berechnet wurden:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left| 2 \left| \vec{F}_{hkl o} \right| - \left| \vec{F}_{hkl c} \right| \right| \cdot e^{i\alpha_{hkl}^{alt}} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

h, k, l = Millersche Indizes

$\vec{F}_{hkl o}$ = gemessener Strukturfaktor hkl (der neu zu lösenden Struktur)

$\vec{F}_{hkl c}$ = berechneter Strukturfaktor hkl (berechnet anhand der Ursprungsstruktur)

α_{hkl}^{alt} = berechnete Phase des Strukturfaktors F_{hkl} (berechnet anhand der Ursprungsstruktur)

$\rho(x, y, z)$ = Elektronendichte am Punkt x, y, z

Zur Darstellung der Unterschiede zwischen den aus dem eingesetzten Model berechneten ($|\vec{F}_{hkl\ c}|$) und den gemessenen Strukturfaktoramplituden ($|\vec{F}_{hkl\ o}|$) wurde eine weitere Elektronendichtekarte (Differenzdichtekarte, $F_o - F_c$) berechnet

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left\| \vec{F}_{hkl\ o} - \vec{F}_{hkl\ c} \right\| \cdot e^{i\alpha_{hkl}^{alt}} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

- h, k, l = Millersche Indizes
 $\vec{F}_{hkl\ o}^{neu}$ = gemessener Strukturfaktor hkl (der neu zu lösenden Struktur)
 $\vec{F}_{hkl\ c}^{alt}$ = berechneter Strukturfaktor hkl (berechnet aus der Ursprungsstruktur)
 α_{hkl}^{alt} = berechnete Phase des Strukturfaktors F_{hkl} (berechnet aus der Ursprungsstruktur)
 $\rho(x, y, z)$ = Elektronendichte am Punkt x, y, z

Eingeführte Mutationen, neue Kofaktoren, sowie Konformationsunterschiede einzelner Aminosäurereste bzw. kleinerer Bereiche im Vergleich zum Ausgangsmodel der WT PBGS aus *P. aeruginosa* wurden mit Hilfe des Programms O⁶⁶ so modelliert, dass eine optimale Übereinstimmung mit beiden Elektronendichtekarten erreicht wurde.

Um eine möglichst gute Übereinstimmung des Modells mit der tatsächlichen Struktur zu erreichen wurde es mit sogenannten Verfeinerungsprogrammen angepaßt. Diese Programme optimieren mittels unterschiedlicher Algorithmen die Lage der Atome in der Elektronendichte unter Einbeziehung geometrischer Parameter (Bindungslängen und -winkel) die sich aus den chemischen Eigenschaften der konstitutiven Aminosäureresten ergeben. Anfangs wurde dazu das Programm CNS⁶⁷ und im weiteren Verlauf *refmac5* (CCP4, Collaborative Computational Project 4)^{64, 68} verwendet. Neben der Strukturverfeinerung berechnen die Programme auch neue Elektronendichtekarten sowie den kristallographischen und den freien R-Faktor⁶⁹. Die beiden Parameter erlauben es, eine Abschätzung vorzunehmen in welchem Maß das Modell der tatsächlichen Struktur entspricht. Dazu werden die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden mit den gemessenen Werten verglichen.

$$R = \frac{\sum_h \sum_k \sum_l \left\| \vec{F}_{hkl\ o} - \vec{F}_{hkl\ c} \right\|}{\sum_h \sum_k \sum_l \left| \vec{F}_{hkl\ o} \right|}$$

- h, k, l = Millersche Indizes
 $\vec{F}_{hkl\ o}^{neu}$ = gemessener Strukturfaktor hkl (aus der neu zu lösenden Struktur)
 $\vec{F}_{hkl\ c}^{alt}$ = berechneter Strukturfaktor hkl (berechnet aus der WT-Struktur)
 α_{hkl}^{alt} = Phase des Strukturfaktors F_{hkl} (berechnet aus der WT-Struktur)
 $\rho(x, y, z)$ = Elektronendichte am Ort mit den Koordinaten x, y, z

Nach obiger Formel liegt der Wert eines R-Faktors mathematisch zwischen 0 und 1, wobei bei Werten über 0,45 nicht mehr von einer statistisch signifikanten Übereinstimmung zwischen Modell und realer Struktur ausgegangen werden kann. Für Strukturen, die wie in der vorliegenden Arbeit aus Datensätzen mit maximalen Auflösungen von 1,5 – 2,2 Å hervorgehen, signalisieren Werte im Bereich von 0,15 bis 0,25 hingegen eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und realer Struktur.

Zur Bestimmung der beiden R-Faktoren wird der Datensatz nach dem Zufallsprinzip in 20 zahlenmäßig gleichgroße Gruppen aufgeteilt. Mit 95 % der Daten wird die Verfeinerung durchgeführt. Aus ihnen wird mit obiger Gleichung der kristallographische R-Faktor berechnet. Die restlichen 5 % der Daten werden ausschließlich dazu verwendet, um nach der Verfeinerung den freien R-Faktor zu berechnen. Beide Faktoren unterscheiden sich meist nur um wenige Prozentpunkte voneinander. Wird der Abstand der beiden zueinander jedoch zu groß, so liegt eine Überanpassung des Modells an die gemessenen Daten vor, ohne dass das entsprechende Modell tatsächlich der realen Struktur in dem Maße entspricht, wie der kristallographische R-Faktor dies andeutet.

Der Zyklus der manuellen Anpassung des Modells an die Elektronendichte und der anschließenden Verfeinerung des neuen Modells mit Hilfe der Verfeinerungsprogramme wurde so lange wiederholt, bis beide R-Faktoren bei minimalen Werten konvergierten ohne zu weit auseinander zu liegen.

3.7.4.8 Qualität der Modellstrukturen

Die Qualität der fortschreitenden Kristallstrukturverfeinerung wurde regelmäßig mit den Programmen PROCHECK^{64; 70} und Whatif⁷¹ überprüft. Beide Programme berechnen unter anderem Ramachandran-Diagramme⁷², die einen graphischen Vergleich der Diederwinkel ϕ und ψ einer jeden Aminosäure zu einander wiedergeben. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung sowie den sterischen Anforderungen der Aminosäureseitenketten sind nur bestimmte Kombinationen von ϕ und ψ energetisch günstig. Aminosäuren hochaufgelöster Proteinstrukturen liegen fast ausnahmslos in den günstigsten Regionen des Ramachandran-Diagramms. Gute Proteinmodelle bei mittlerer bis mittelhoher Auflösung zeichnen sich dadurch aus, dass mehr als 90 % aller Aminosäurereste in den sogenannten erlaubten Regionen liegen, die verbleibenden in den „zusätzlich erlaubten“ Regionen. Die Anzahl der Reste in „unerlaubten“ Regionen sollte möglichst niedrig (als Faustregel unter 1,0 %)

liegen. Die Programme PROCHECK und Whatif analysieren zudem weitere geometrische Parameter des Modells. Bei Whatif sind dies zum Beispiel die Benennungskonventionen einzelner Atome unter Berücksichtigung der Seitenkettenkonformation, aber auch die Temperaturfaktorverteilung im Protein, die Konsistenz nichtkristallographischer Symmetrien und die Vollständigkeit des Wasserstoffbrücken-Musters. Darüber hinaus wird die mathematische Gewichtung geometrischer Parameter gegenüber kristallographisch gemessener Daten, den Strukturfaktoramplituden, während der Verfeinerung statistisch analysiert.

3.7.4.9 Hinterlegung der Daten bei RCSB Protein Data Bank

Alle Strukturen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt wurden, wurden bei der internationalen Datenbank für Proteinstrukturen, der RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>), hinterlegt.

3.7.4.10 Anfertigung von Darstellungen der Proteinstrukturen

Alle Darstellungen von Proteinstrukturen wurden mit Hilfe der Programme Pymol (Delano Scientific LLC, San Carlos, USA), sowie MOLSCRIPT⁷³ und Raster3D angefertigt⁷⁴.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Der katalytische Mechanismus der PBGS aus *P. aeruginosa*

4.1.1 Grundlegende Überlegungen

Der erste Schritt in der Aufklärung des katalytischen Mechanismus der PBGS bestand in der detaillierten Charakterisierung der Erkennung und Bindung der Substratmoleküle durch das Protein. Daran anschließend sollten Übergangsstufen und Zwischenprodukte der Reaktion charakterisiert werden. Im Zentrum stand dabei die Frage, welcher der zwei postulierten Mechanismen, Jordan I (C-C-Bindungsbildung vor C-N-Bindungsbildung) oder Jordan II (C-N-Verknüpfung vor CC-Verknüpfung) verfolgt wird (Abb. 4) ³².

Erschwert werden solche Untersuchungen im Allgemeinen durch die sehr kurze Halbwertszeit der Reaktionszwischenprodukte. Daher wurden Inhibitoren zur Kokristallisation mit dem Enzym verwendet, um die Wechselwirkungen zwischen der PBGS und diesen Substrat- bzw. Zwischenproduktanaloga zu beschreiben und zu analysieren. Dadurch sollten Erkenntnisse über die durchlaufenen Teilschritte während der Katalyse gewonnen werden. Aus zwei Gründen lag das Hauptaugenmerk dabei darauf, einen Substratanalogon-Enzym-Komplex zu erhalten, indem eines der Inhibitormoleküle in der A-Stelle bindet. Zum einen war die Substratbindung in dieser Bindestelle bislang noch nicht eindeutig beschrieben worden. Zum zweiten wiesen die bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung des zweiten Substratmoleküls den Ablauf der Reaktion auslöst. Der Zustand, dass das zweite Substratmolekül in Bindestelle A gebunden vorliegt, ist demnach im Gegensatz zu der Bindung des ersten Substrats in der P-Stelle sehr kurzlebig. Folglich konnten in der P-Stelle schon mehrfach kokristallisierte Substratanaloga in Kristallstrukturen nachgewiesen werden ^{32; 35; 40; 75} in der A-Stelle jedoch noch nicht.

Sämtliche Substrat- und Zwischenproduktanaloga, die in meiner Diplomarbeit bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf PBGS charakterisiert worden waren, wurden zu Kokristallisationsversuchen mit WT *Pa*PBGS sowie mit einigen Mutanten des Enzyms verwendet. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Reinhard Neier (Universität Neuchâtel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Ergebnisse

4.1.2.1 Die Struktur des Komplexes aus PBGS D139N und 5-Fluorolävulinsäure

Aus der Kombination von 5-Fluorolävulinsäure (5F-LA) mit der PBGS-Mutante D139N konnten Kristalle eines Komplexes dieser beiden Moleküle erhalten werden. Die Struktur wurde durch Differenzfouriersynthese aufgeklärt, wobei die Struktur von WT *Pa*PBGS als Modell diente³⁵. Sie wurde mit sinnvollen kristallografischen und stereochemischen Parametern bis zu einer Auflösung von 1,66 Å verfeinert (**Tab. 5**). Das erhaltene Modell der PBGS D139N enthält vier Moleküle 5F-LA, ein vollständig sowie ein teilweise besetztes Na⁺-Ion, zwei K⁺-Ionen, zwei Mg²⁺-Ionen und zwei Sulfationen. Die Reste 1 bis 6 und 336 bis 337 in Monomer A und die Reste 1 bis 5, 221 bis 228, und 336 bis 337 in Monomer B sind aufgrund unzureichend definierter Elektronendichte nicht im Modell enthalten. 98,8 % der Aminosäurereste liegen in den erlaubten Bereichen des Ramachandran Plots. Die mittlere Abweichung der Hauptkettenatome zwischen der neuen Struktur des Komplexes und der Struktur von WT PBGS beträgt 0,188 Å für Monomer A und 0,942 Å für Monomer B.

4.1.2.2 Die Struktur des Komplexes PBGS D139N/5F-LA im Überblick

Der Grundbaustein der aktiven, oktameren Form der PBGS D139N ist das asymmetrische Dimer. Monomer A zeigt einen signifikant niedrigeren durchschnittlichen B-Faktor und ist allgemein strukturell etwas besser definiert als Monomer B. Das aktive Zentrum in Monomer A nimmt die geschlossene Konformation ein, wobei der Deckel, die darüber liegende Schlaufe, geordnet ist und es vom umgebenden Medium abschirmt. Im Monomer B ist der Deckel teilweise ungeordnet, was als offene Konformation bezeichnet wird. Hier ist das aktive Zentrum von außen zugänglich. Diese Asymmetrie koinzidiert mit der unterschiedlichen Besetzung der Metallbindestelle MgC. Im geschlossenen Monomer A ist sie vollständig mit einem Magnesiumion besetzt, in Monomer B hingegen liegt der Grad der Besetzung bei 0,5. In der Struktur von WT PBGS³⁵ ist die Bindestelle MgC in Monomer B sogar vollkommen leer. Die zwei Monomere eines Dimers stellen also zwei unterschiedliche Zustände des Enzyms dar.

Tab. 5: Kristallographische Daten.

A. Datensammlung		Datensatz I	Datensatz II
Raumgruppe		<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2
Zelldimensionen (a,c (Å))		127,5; 86,1	127,1, 86,2
Reflexe, total ^a / einmalige		509802 / 56270	433947 / 82775
Auflösungsbereich ^b (Å)		50,0 – 1,9 (1,97–1,90)	20,0 – 1,66 (1,72–1,66)
Vollständigkeit ^b (%)		99,9 (100)	99,9 (100)
Redundanz ^b		9,1 (8,9)	5,2 (4,9)
$R_{\text{merge}}^{\text{b,c}}$ (%)		14,1 (60,3)	11,6 (39,4)
I/σ_I^{b}		17,4 (3,7)	11,0 (4,1)
Wasseranteil (%)		61	60,5
Mittlerer Temperaturfaktor (Å ²)		19,7	21,8
B. Verfeinerung		Datensatz II	
Auflösungsbereich ^d (Å)		91,3 – 1,66	
Reflexe (>1σ)		78644	
Nicht-H-Proteinatome / Dimer		5079	
Wassermoleküle / Dimer		670	
Lävulinsäureatome / Dimer		4	
Ionen / Dimer: Na ⁺ ; K ⁺ ; Mg ²⁺ ; SO ₄ ²⁻		1+0,5; 2; 2; 2	
Mittlerer B-Faktor (Å ²): Monomer A; Monomer B;		20,7; 25,0; 38,5	
Wasser			
R-Factor (%); $R_{\text{free}}^{\text{e}}$ (%)		17,5; 19,8	
Ramachandran Plot: Bevorzugte Regionen; Ausreißer ^f		91,6; 0,2	
Mittlere Abweichung von Idealwerten:		0,02; 1,9	
Bindungslängen (Å); Bindungswinkel (deg.) ^g			
Mittlere örtliche Abweichung der Hauptkettenatome zwischen den Monomeren A and B (Å)		0,48	
Angenommener allgemeiner Koordinatenfehler (Å)		0,1	
Kommentare:			
^a : > 1 σ			
^b : Wert für die Schale höchster Auflösung in Klammern			
^c : $R_{\text{merge}} = 100 \cdot (\sum_{h,i} I_{h,i} - I_h / \sum_{h,i} I_{h,i})$, wobei die Summe gebildet wird aller Observationen $I_{h,i}$, die zur Reflexintensität I_h beitragen.			
^d : F_c für den Bereich 87,71–20,0 Å.			
^e : 5% der Daten wurden abgetrennt zur Berechnung von $R_{\text{free}}^{\text{e}}$			
^f : berechnet mit Procheck ⁷⁰			
^g : berechnet mit Whatif ⁷¹			

4.1.2.3 Bindung von 5-FLA in A- und P-Stelle

Bindung von 5F-LA in Monomer A

Im Komplex PBGS D139N/5F-LA spiegelt sich die Asymmetrie sogar in der Besetzung der Substratbindestellen wieder. Im Monomer A befindet sich in beiden Substratbindestellen (A- und P-Stelle) je ein Molekül 5F-LA mit voller Besetzung (**Abb. 12** und **13**).



Abb. 12: Stereographische Ansicht des aktiven Zentrums des PBGS D139N Monomers A. α -Helices sind in blau dargestellt, β -Stränge in gelb. Der Deckel, der das aktive Zentrum bedeckt, ist rosa eingefärbt.

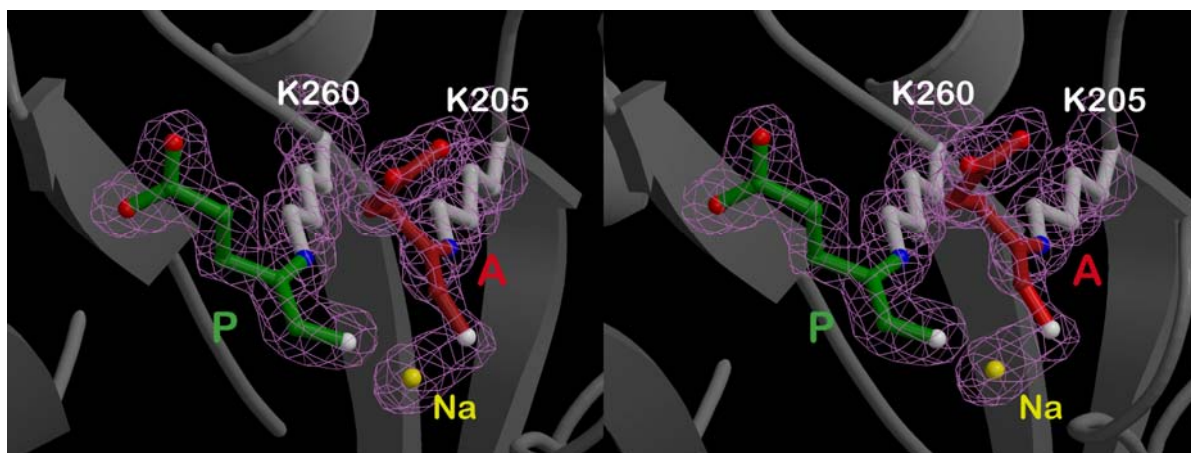


Abb.13: Die endgültige $2F_o - 2F_c$ -Elektronendichte von 5F-LA (magenta, konturiert bei $1,5 \sigma$) in den Substratbindestellen A und P von Monomer A. Die Inhibitormoleküle sind über Schiffbasenbindungen kovalent mit Lys205 und Lys260 verknüpft, die sich an den C-terminalen Enden der β -Stränge befinden und linear in den zentralen Hohlraum des Monomers ragen. Das Natriumion ist als gelbe Kugel dargestellt.

Die Konformation von 5F-LA in der P-Stelle ist nahezu identisch zu einer der beiden Konformationen von ALA, dem natürlichen Substrat, wie sie im Komplex Hefe PBGS/ALA gefunden wurden (**Abb. 14**)⁷⁵. 5F-LA ist durch den Ersatz seiner Oxogruppe in Position 4

durch N^ε von Lysin 260 kovalent durch eine Schiff-Base an das Enzym gebunden, wie dies schon für den Inhibitor LA und später auch ALA gezeigt werden konnte (Abb. 12-14).

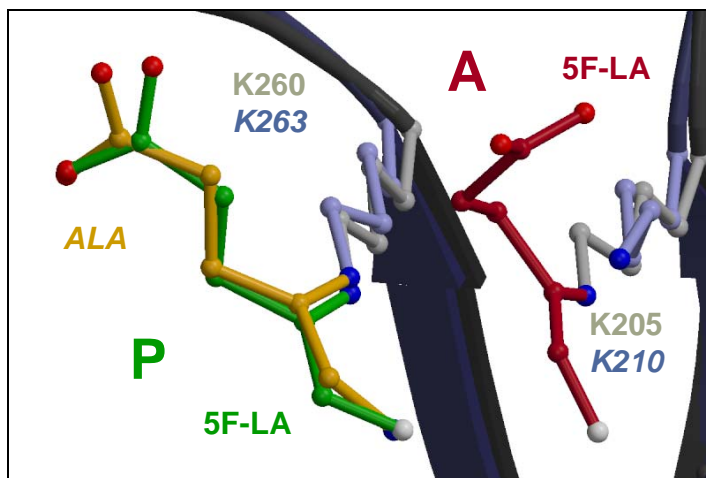


Abb. 14: Überlagerung der Substratbindestellen des Komplexes Hefe PBGS/ALA (blau) mit den Bindestellen des Komplexes *Pa*PBGS/5F-LA (grau). ALA aus dem ersten Komplex ist gelb eingefärbt, die 5-Fluorlävulin-säuremoleküle des zweiten Komplexes sind in grün (P-Stelle) bzw. rot (A-Stelle) dargestellt.

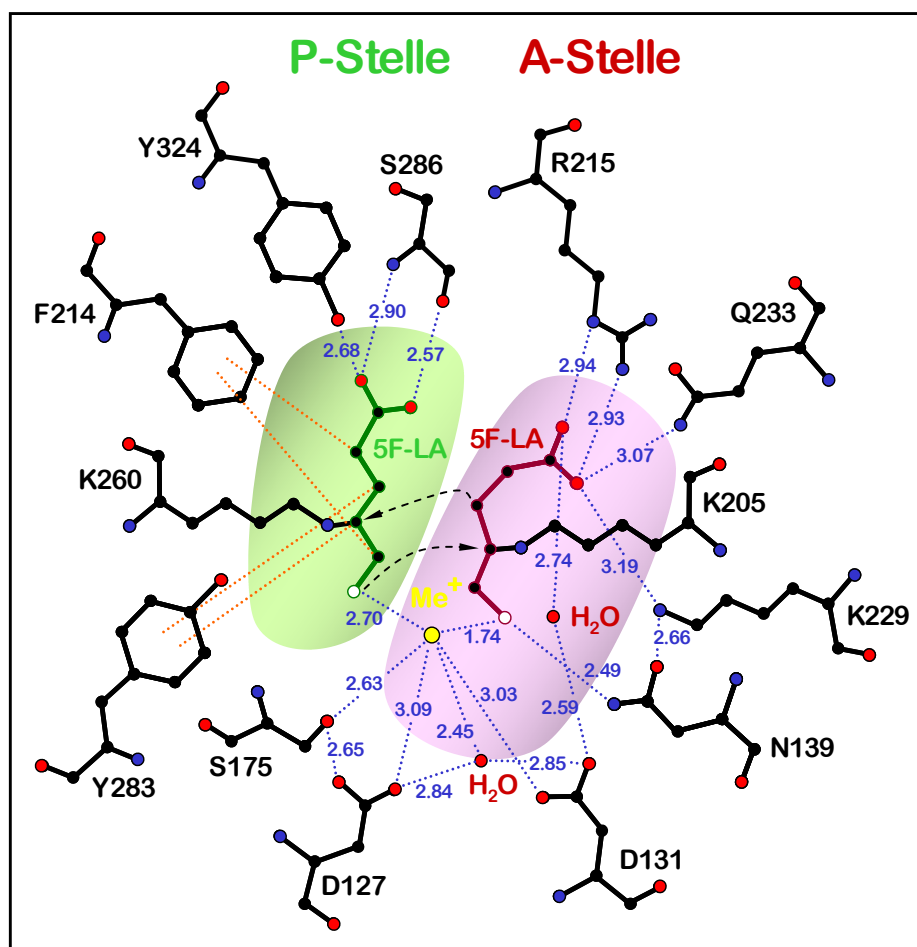


Abb. 15: Schema des aktiven Zentrums von *Pa*PBGS D139N, Monomer A. Die Substratbindestelle P ist in grün unterlegt, die A-Stelle in rosa. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch blaue, gepunktete Linien repräsentiert, hydrophobe Wechselwirkungen durch gepunktete Linien in orange. 5F-LA in der P-Stelle ist in grün gezeigt, dasjenige in der A-Stelle in weinrot. Aminosäurereste des Proteins sind in schwarz gehalten und das monovalente Metallkation in gelb. Die Zahlenwerte geben die Abstände in Å an.

Die Carboxylgruppe von 5F-LA bildet Wasserstoffbrücken zum Hauptkettenstickstoffatom von S286 und zu den Hydroxylgruppen von S286 und Y324 (**Abb. 15**). Der Rest der P-Stelle ist eine hydrophobe Tasche, gebildet durch die aromatischen Seitengruppen von F86, F214 und Y283, die sich im Van-der-Waals-Abstand zu den apolaren Seitengruppen von 5F-LA befinden. Diese Interaktionen stabilisieren die Bindung des Substrats und verhindern die vorzeitige Hydrolyse der Schiff-Base. Das Fluoratom im 5F-LA nimmt dabei nahezu exakt die gleiche Position ein wie die Aminogruppe von ALA, im Komplex Hefe PBGS/ALA (**Abb. 14**). Es ist in Kontakt (2,7 Å) mit einer gut definierten sphärischen Elektronendichte, die durch die Besetzung mit einem Natriumion erklärt wurde, das zwischen P- und A-Stelle liegt. Interessanterweise zeigt die Struktur eine definierte Elektronendichte in der A-Stelle, die sich eindeutig durch ein weiteres Molekül 5F-LA beschreiben lässt. Wie in der P-Stelle wird 5F-LA durch eine Schiffbasebindung zwischen seinem Kohlenstoffatom C4 und N^ζ eines Lysinrestes, hier Lysin 205 kovalent an das Enzym gebunden. Die Carboxylgruppe des Inhibitors bildet Salzbrücken mit den funktionellen Gruppen von R215 und K299 aus der Deckelregion (**Abb 15**). Das Fluoratom ist in räumlicher Nähe (2,49 Å) zu N^δ von N139. O^δ von N139 bildet zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu N^ζ von K299 aus dem Deckel. Die Einnahme der geordneten Konformation der Deckelregion, die einer Schließung des aktiven Zentrums entspricht, unterstützt folglich die Bindung des zweiten Substratmoleküls durch die Bereitstellung der Reste K299 und R215.

Die Konformation der zwei Inhibitormoleküle wird durch die kovalenten Schiffbasebindungen und die Fixierung der Carboxylatgruppen via Wasserstoff- bzw. Salzbrücken diktiert. In beiden Molekülen erstreckt sich die Planarität, die durch die Schiffbasebindung hervorgerufen wird, über C3 – C5 hinaus bis zu den Fluoratomen (**Abb. 7**). Diese planaren Grundkonformationen der beiden Moleküle sind ihrerseits nahezu koplanar zueinander ausgerichtet. Ebenso liegen die sie fixierenden Lysinreste 260 und 205 linear elongiert und nahezu parallel zueinander. Im 5F-LA-Molekül in der P-Stelle endet die Planarität bei Atom C3, im Inhibitor in der A-Stelle hingegen schließt die Planarität sogar noch Atom C2 ein. Diese sp²-artige Konformation des C2-Atoms, die frei in Lösung wegen Repulsionen innerhalb des Moleküls nur extrem schwach populiert wäre, erleichtert in erheblichem Maße die Deprotonierung von C2 zur Bildung eines reaktiven Enamins, da keine weiteren strukturellen Änderungen mehr nötig sind und stellt folglich eine Aktivierung des Substratanalogons in Bindestelle A dar.

Bindung von 5F-LA in Monomer B

In Monomer B sind die Aminosäuren 220 bis 231 der Deckelregion ungeordnet, wodurch das aktive Zentrum vom umgebenden Medium aus zugänglich ist. Die Konformation von 5F-LA in der P-Stelle ist insgesamt identisch zu derjenigen in Monomer A. In der A-Stelle ist das Inhibitormolekül jedoch nur in einem Teilbereich, der Carboxylatgruppe, eindeutig durch die Elektronendichte definiert. Die Carboxylatgruppe bildet eine Salzbrücke zu R215 sowie eine Wasserstoffbrücke zu Q233 wie im Monomer A. Der Rest des Moleküls ist weniger gut definiert, daher wurden drei verschiedene Konformationen modelliert, die die Elektronendichte am besten erklären. Dieser schlecht geordnete Zustand des Inhibitors in der A-Stelle fällt mit der Abwesenheit von K229 zusammen. In einer der Konformationen liegt 5F-LA wie in Monomer A kovalent gebunden an K205 vor. Die beiden anderen Konformationen stellen frei vorliegendes 5F-LA dar. In einer dieser beiden Konformationen liegt das zugehörige Fluoratom auf der Position des Natriumions, weshalb dieses nur mit einer Besetzungszahl von 0.5 belegt worden ist. Monomer B zeigt verschiedene Zustände der A-Stelle vor der Schließung des aktiven Zentrums und dem Beginn der Katalyse.

4.1.2.4 Wechselwirkungen zwischen dem aktiven Zentrum und MgC

Im Komplex WT PBGS/LA³⁵ nimmt Asp 139 in den Monomeren A und B zwei unterschiedliche Orientierungen ein. In Monomer A mit geschlossenem Deckel zeigt es in Richtung zum aktiven Zentrum, wogegen es in Monomer B mit ungeordneter Deckelregion eine Salzbrücke mit R181 ausbildet. Im Komplex PBGS D139N/5F-LA nimmt N139 die jeweils gleichen Orientierungen ein. In Monomer A bildet es dabei Wasserstoffbrückenbindungen zum Fluoratom des Inhibitors in der A-Stelle und zu K299 aus. In Monomer B nimmt es die vom aktiven Zentrum abgewandte Orientierung ein, obwohl R181 als Wechselwirkungspartner fehlt und auch in Monomer B zur teilweise besetzten Bindestelle MgC zeigt. Das lässt vermuten, dass im aktuellen Komplex keine direkte Kommunikation zwischen dem aktiven Zentrum und MgC stattfindet, wie es zuvor für den Komplex WT PBGS/LA postuliert worden war. Vermutlich ist dies auf die eingeführte Mutation D139N zurückzuführen. Zusätzliche Faktoren, wie die einheitliche Bindung von 5F-LA und die Schließung des Deckels, scheinen notwendig zu sein, um N139 in die dem aktiven Zentrum zugewandte Konformation zu bringen.

4.1.2.5 Ein monovalentes Kation im aktiven Zentrum

Es ist bereits früher für PBGS aus *B. japonicum*⁴⁴ und *P. aeruginosa*³⁶ beschrieben worden, dass monovalente Kationen sowohl die katalytische Effizienz erhöhen als auch die Oligomerisierung als Oktamer stabilisieren. In Übereinstimmung mit diesen Befunden war in der vorliegenden Struktur erstmals ein monovalentes Kation im aktiven Zentrum von Monomer A nachweisbar, welches zwischen den beiden Substratbindestellen P und A lokalisiert ist. Der Temperaturfaktor und die chemische Natur der Liganden des Kations lassen den Schluss zu, dass es sich um ein Natriumion handelt. Im natürlichen Umfeld besetzen zwei Aminogruppen der Substratmoleküle ALA zwei der Koordinationsstellen des Metallions, weshalb dort diese Position möglicherweise durch ein Kaliumion besetzt wird. Das Natriumion im vorliegenden Komplex wird durch die funktionellen Gruppen von D127, D131 und S175, den beiden Fluoratomen und einem Wassermolekül koordiniert. Diese Koordinationsphäre ist Teil eines Netzwerks von hydrophilen Wechselwirkungen, das sich fast über den gesamten Bereich des aktiven Zentrums erstreckt (**Abb. 9**). Wie bereits oben erläutert wurde, ist das Natriumion in Monomer B nur mit einer Besetzung von 0,5 modelliert worden, da durch die schlechte Definition des Deckels und Inhibitors in der A-Stelle eine eindeutige Interpretation der Elektronendichte in diesem Bereich nicht möglich ist.

4.1.2.6 Mutierte Porphobilinogensynthasen

Die Kristallstrukturen von WT *Pa*PBGS und D139N/5F-LA PBGS zeigen eine Reihe von Aminosäurereste, die an der Na⁺-Koordination, der Kommunikation zwischen MgC und aktivem Zentrum sowie der Substratbindung in A- und P-Stelle beteiligt sind. Um ihre Bedeutung für die Katalyse zu charakterisieren wurden daher folgende gerichtet mutierte PBGSen hergestellt und auf ihre Aktivität getestet: D131E (Na⁺-Koordination), D139N (Kommunikation MgC/aktives Zentrum und Substratkoordination in der A-Stelle), K205S und Q233E (Substratkoordination in der A-Stelle) und K260A (Substratkoordination in der P-Stelle). Alle diese Mutationen führten zum vollständigen Verlust der Aktivität (Werte für D131E und Q233E aus Frère *et al.*⁴⁸).

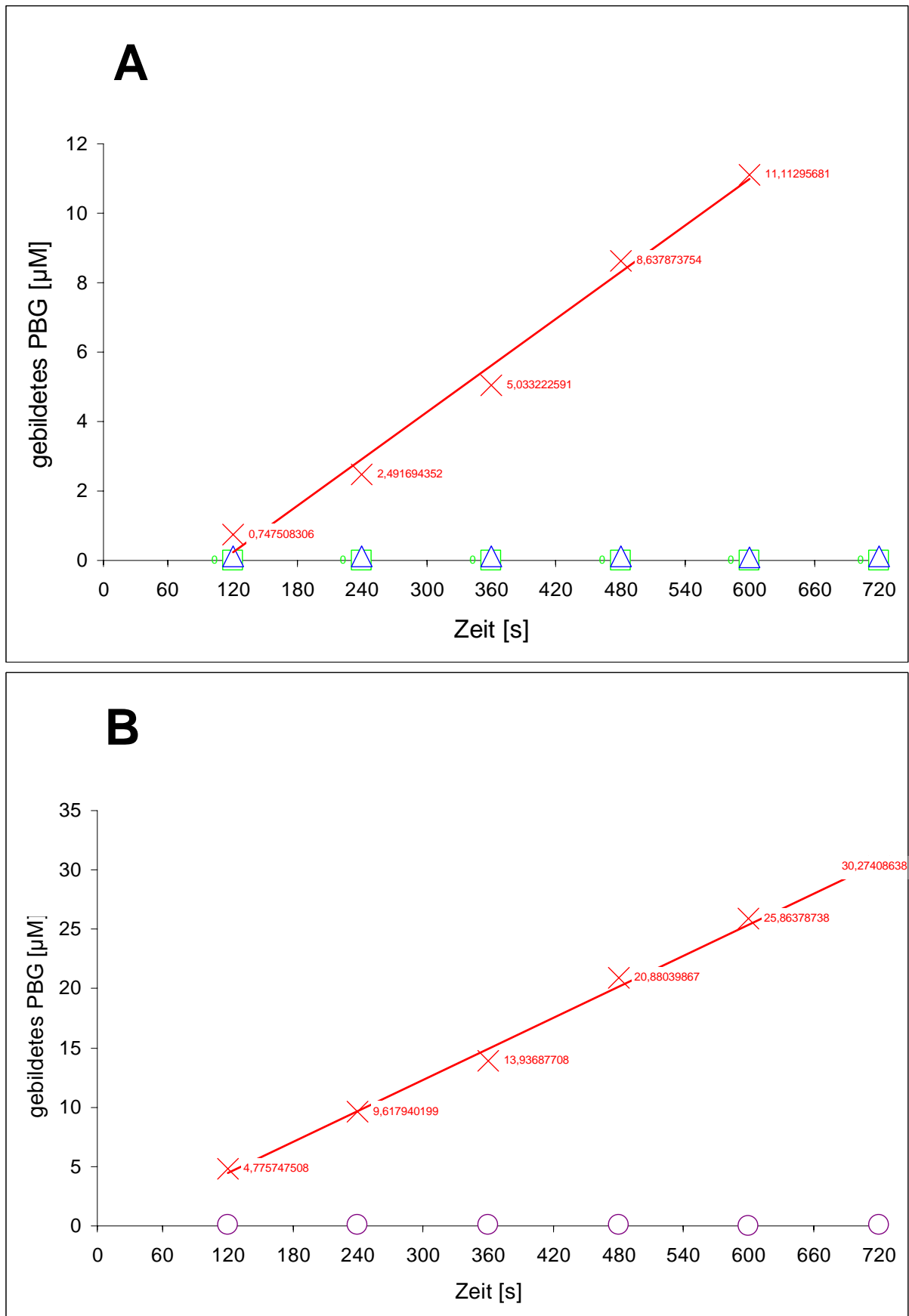


Abb. 16 : Bestimmung der relativen Enzymaktivitäten von PBGS D139N, PBGS K205S und PBGS K260A. Es wurde die lineare Zunahme von PBG mit der Zeit bestimmt, die Proteinkonzentration war 15 (A) bzw. 30 (B) mg/ml. A) X WT PBGS, □ PBGS K205S, PBGS D139N, ○ PBGS K260A

4.1.2.7 Inhibition der PBGS

Lävulinsäure LA, ein Inhibitor mittlerer Potenz, konnte in verschiedenen Proteinstrukturen jeweils nur in Bindestelle P nachgewiesen werden, 5F-LA hingegen in der vorliegenden Struktur auch in der Bindestelle A. Daher wurde für beide Inhibitoren der IC_{50} -Wert in einem „dose-response plot“ bestimmt (**Abb. 17**).

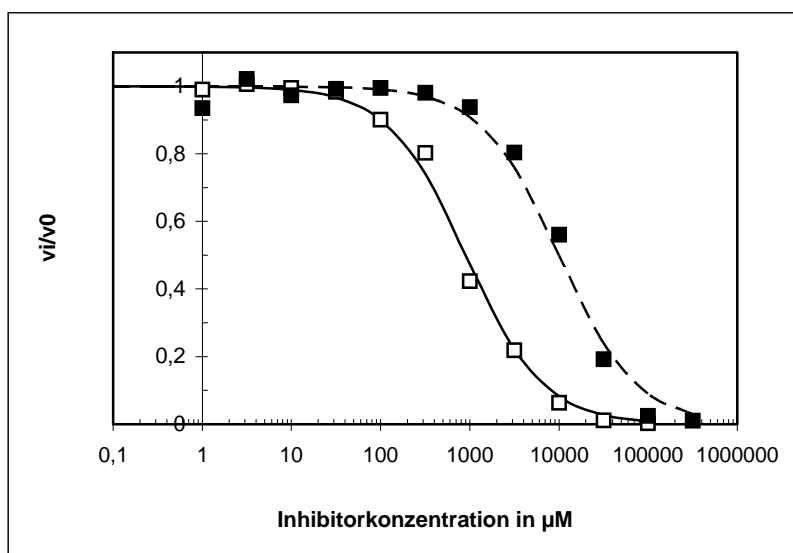


Abb. 17: „dose response plot“ für die Inhibitoren LA (■--■) und 5F-LA (□—□), v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor, v_i = Reaktionsgeschwindigkeit bei jeweiliger Inhibitorkonzentration

Der IC_{50} -Wert von $0,9 \pm 0,07$ mM für 5F-LA liegt um den Faktor 11 unter dem Wert für LA (10 ± 1 mM). Dieser verbesserte Wert von 5F-LA ist auf das zusätzliche Fluoratom und die Wechselwirkungen dieses Atoms mit dem Enzym zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit der vorliegenden Kristallstruktur, die zeigt, dass die Fluoratome beider Inhibitormoleküle wichtige hydrophile Wechselwirkungen mit umgebenden Resten und dem Natrium ausbilden und damit an der Ausbildung des Netzwerks hydrophiler Bindungen beteiligt sind. Wie bereits erwähnt wurde, nimmt 5F-LA in der Bindestelle P die gleiche Konformation ein wie das isostere ALA im Komplex Hefe PBGS/ALA (**Abb. 14**)⁷⁵. Der Vergleich zwischen dem Komplex *Pa*PBGS D139N/ 5F-LA und dem Komplex *Pa*PBGS/PBG (**Abb. 18**) zeigt, dass die Carboxylgruppen des Produktes sich an vergleichbaren Positionen wie die Carboxylgruppen der 5F-LA-Moleküle befinden und deshalb auch von denselben Resten koordiniert werden.

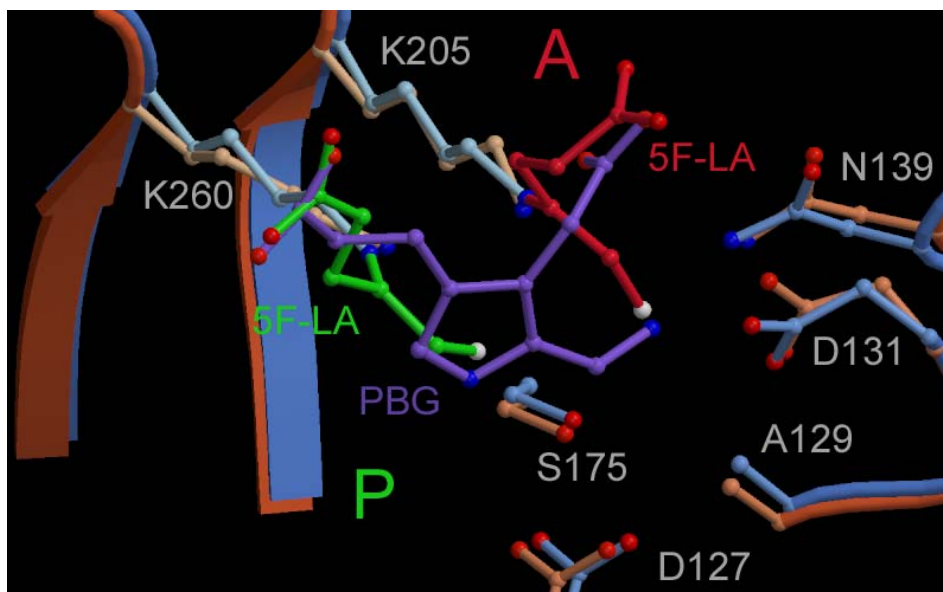


Abb. 18: Überlagerung des aktiven Zentrums der PBGS-D139N Mutante (orange) im Komplex mit PBG (lila) (aus Frère *et al.* 2000⁴⁸) mit dem aktiven Zentrum von PBGS D139N (blau) im Komplex mit 5F-LA (grün und rot). In der P-Stelle fallen die Carboxylgruppen von 5F-LA und PBG fast exakt aufeinander. In der A-Stelle liegt ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe von PBG zwischen den beiden Sauerstoffen der Carboxylgruppe von 5F-LA. Das Fluoratom von 5F-LA in der A-Stelle befindet sich fast an der gleichen Position wie die verbliebende Aminogruppe des PBG.

Darüber hinaus entspricht die Lage des Fluoratoms des Inhibitors in der A-Stelle der Position der verbliebenen Aminogruppe des Produktmoleküls (**Abb. 18**). Hieraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass 5F-LA auch in der A-Stelle ein guter Repräsentant für ALA ist und den Zustand vor dem Start der Reaktion reflektiert.

4.1.3 Diskussion: Mechanismus der Porphobilinogen synthase aus *P. aeruginosa*

4.1.3.1 Substratbindung in der Porphobilinogen synthase aus *P. aeruginosa*

Die Porphobilinogen synthase katalysiert eine ungewöhnliche Reaktion, die asymmetrische Kondensation zweier identischer Substratmoleküle. Um dies leisten zu können, muss sie, im Gegensatz zur nicht enzymatisch katalysierten Reaktion, bei der ein symmetrisches Nebenprodukt entstehen kann, beide Substratmoleküle gleichzeitig in unterschiedlichen Bindestellen (A- und P-Stelle) erkennen, binden und so orientieren, dass das gewünschte Produkt gebildet wird (**Abb. 19**). Die exakte strukturelle Beschreibung dieser Bindung und der beteiligten Wechselwirkungen ist Grundlage zum detaillierten Verständnis des Reaktionsablaufes. Denn zusätzlich zur Bindung (räumliche Nähe) und Orientierung der Substratmoleküle fördern Enzyme die Reaktionsgeschwindigkeit zumeist durch eine Stabilisierung der Übergangszustände

wodurch die Umsatzrate erhöht wird. Durch die Immobilisation des Adduktes von ALA am Enzyme in der Bindestelle P mittels Reduktion mit NaBH_4 war schon früh die kovalente Bindung dieses Substratmoleküls per Schiffbase an das Enzym nachgewiesen worden ⁷⁶.

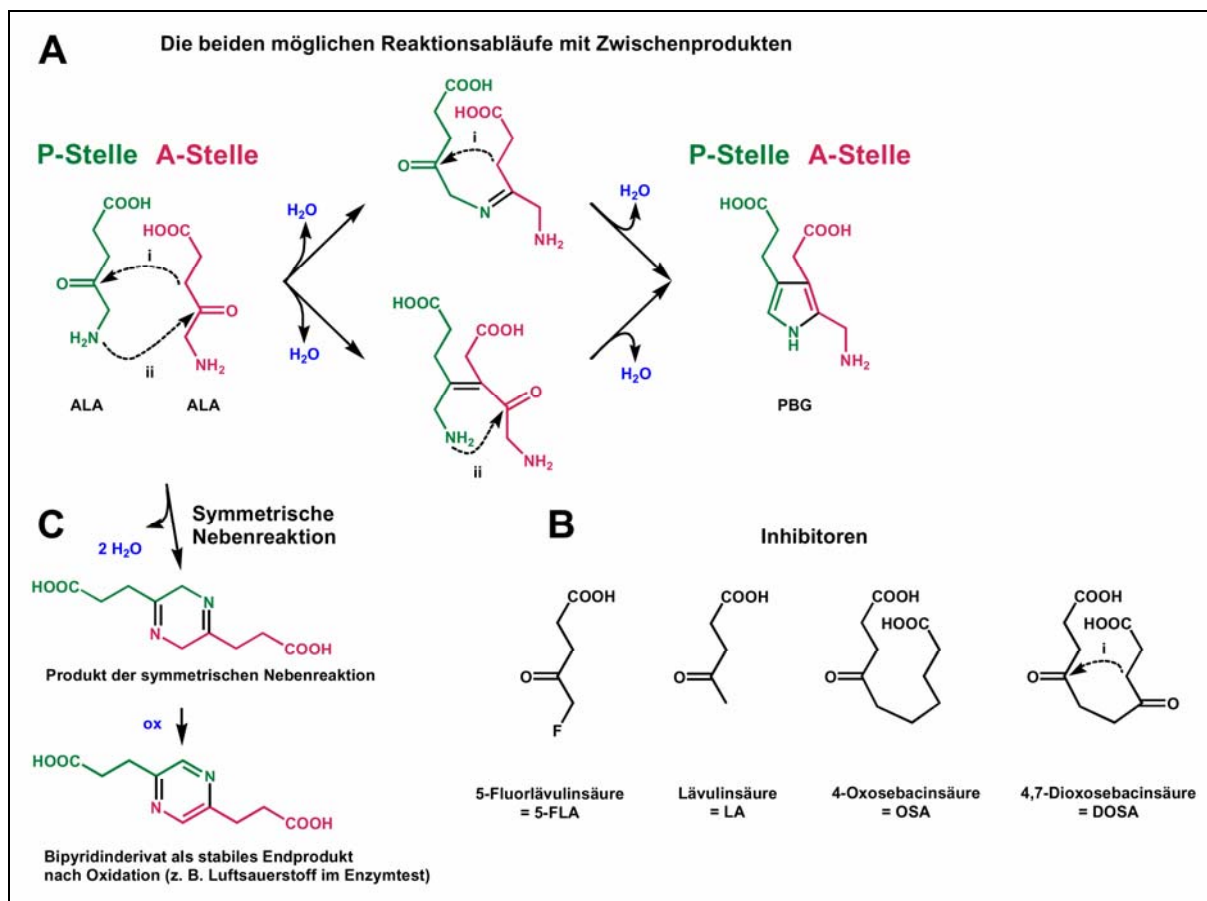


Abb. 19: Illustration der möglichen Reaktionswege der Kondensation von 2 Molekülen ALA durch PBGS inklusive Nebenreaktion und Inhibitoren. A) Da zwei Bindungen gebildet werden (i: C-C-Bindung; ii: C-N-Bindung) ergeben sich zwei mögliche Reaktionswege mit zwei unterschiedlichen Zwischenprodukten. B) Substratanaloge Inhibitoren, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurden (5F-LA, LA) und potentielle Intermediatanaloga wie sie zur Kokristallisation mit *ScPBGS* und *EcPBGS* eingesetzt wurden. C) Bei der unkatalysierten Reaktion entsteht in erheblichem Maße ein symmetrisches Nebenprodukt, vor allem unter aeroben Bedingungen, unter denen es zu einem sehr stabilen Bipyridinderivat oxidiert wird.

Diese Art der Bindung wurde durch die Kristallstrukturen von PBGSen im Komplex mit LA und ALA bestätigt ^{32; 35; 40; 75}. Entsprechend war die P-Stelle schon früh gut charakterisiert. Für die Art der Bindung des Substrats in der Bindestelle A und die Form seiner Aktivierung waren jedoch verschiedene Modelle postuliert worden ^{45; 77}. Einerseits wurde die Bindung und Aktivierung des ALA-Moleküls durch Bindung seiner Carbonylgruppe an ZnB unter Verdrängung des Wassermoleküls vorgeschlagen. Andererseits wurde eine kovalente Bindung über eine Schiffbase an ein weiteres Lysin diskutiert, analog der Substratfixierung in der Bindestelle P. In der Zwischenzeit sind drei Kristallstrukturen veröffentlicht worden: DOSA und OSA, Repräsentanten möglicher Zwischenprodukte, im Komplex mit PBGS aus Hefe ⁷⁷, so-

wie DOSA in Komplex mit PBGS aus *E. coli* (*EcPBGS*)⁴⁵ (**Abb. 13**). Beide Inhibitoren binden in ähnlicher Konformation in beiden Bindestellen, wobei DOSA Schiffbasen zu beiden Lysinen ausbildet, OSA aufgrund der fehlenden zweiten Carbonylfunktion jedoch nur die Schiffbase in Bindestelle P. Die Carboxylgruppen der Inhibitoren werden dabei von den entsprechenden Resten koordiniert, wie das in der P-Stelle für Inhibitoren, Substrat und Produkt und in der A-Stelle schon für das Produkt gezeigt worden war. DOSA war als Analogon eines der beiden möglichen Reaktionszwischenprodukte konstruiert worden, bei dem die C-N-Bindung als erste geschlossen worden wäre. Allerdings fehlt dem Molekül die freie Aminogruppe des möglichen Intermediates. Außerdem weisen alle drei Strukturen kleine Unstimmigkeiten auf. So wurde in den Strukturen des Enzyms aus Hefe, die durch die Schiffbasen implizierte Planarität an den C-N-Bindungen zwischen Inhibitor und dem jeweiligen Lysin moduliert. Allerdings ragen dabei einige Atome aus der Elektronendichte heraus. In der Struktur von *EcPBGS* im Komplex mit DOSA sind alle Atome in die Elektronendichte moduliert worden, dabei sind jedoch an den beiden an den Schiffbasebindungen beteiligten C-Atomen erhebliche Abweichungen von der Planarität zugelassen worden.

Der hier präsentierte Komplex zwischen *PaPBGS* D139N und 5F-LA erlaubte es erstmals neue Erkenntnisse über den Startpunkt der katalytischen Reaktion und die darauf folgenden Schritte zu gewinnen, da er die erste Struktur darstellt, in der zwei einzelne identische Substratanaloga in beiden Bindestellen gebunden vorgefunden wurden. Die eindeutige Elektronendichte ermöglicht eine derartige Modellierung der Inhibitoren, dass der gesamte Raum des aktiven Zentrums unter gleichzeitiger Einhaltung aller konformationellen Beschränkungen, die durch die Schiffbasenbindungen diktiert werden, erfüllt ist. Alle Reste, die mit den Substratmolekülen wechselwirken, vor allem in der A-Stelle, lassen sich klar bestimmen. Die Eindeutigkeit der Elektronendichte und den daraus abgeleiteten Konformationen lassen den Schluss zu, dass es unwahrscheinlich ist, dass das Substrat in der P-Stelle als erstes deprotoniert wird. Das Substrat in der A-Stelle ist hingegen in eine Konformation gezwungen, die es aktiviert und perfekt für eine Deprotonierung in Position 2 als erstem Schritt zur Bildung eines reaktiven Enamins vorbereitet.

Zur Funktion monovalenter, sowie divalenter Kationen in PBGSen ohne ZnB sind eine Reihe von Untersuchungen und darauf basierende Postulate veröffentlicht worden^{36; 44; 78; 79; 80; 81; 82}. Der hier aufgeklärte Komplex zeigt zum ersten Mal ein monovalentes Kation im aktiven Zentrum und lässt die Vermutung zu, dass es *in vivo* benötigt wird, um das Substrat in einer spezifischen Konformation in der polaren Bindestelle A zu fixieren und die Reaktivität der Aminogruppe des P-Stellensubstrats zu modulieren. Interessant ist, dass auch in dieser Struktur

die Asymmetrie zwischen den Monomeren erhalten bleibt. Der Zustand in Monomer B wird als einen Übergangszustand beim Auffüllen der Bindestelle A interpretiert.

Für den Übergang von dem teilweise gefüllten Zustand in Monomer B zum vollständig gefüllten in Monomer A bedarf es einer schnellen Abfolge von Ereignissen. Das monovalente Kation tritt in das aktive Zentrum ein, wo es von D127, D131 und S175, einem Wassermolekül und der Aminogruppe der ALA aus der P-Stelle stabilisiert wird. Das zweite ALA-Molekül tritt ein, wird koordiniert und vororientiert durch seine Carboxylgruppe und nimmt eine Konformation ein, so dass seine Aminogruppe in die Nähe des Kations kommt. Anschliessend bildet sich die Schiffbasenbindung zu K205 aus. D139 schwenkt in das aktive Zentrum um und bildet eine Salzbrücke mit der Aminogruppe des A-Stellen Substrats. Der vorherige Salzbrückenpartner von D139, R181 klappt in Richtung der Metallbindestelle MgC und stabilisiert durch Wasserstoffbrücken die hauptsächlich auf Wassermolekülen aufgebaute Koordinationssphäre des darin bindenden Mg^{2+} -Ions. Durch kleine konformationelle Änderungen in der benachbarten Region des Arms von Monomer B wird dabei möglicherweise der neue Zustand des aktiven Zentrums in Monomer A an Monomer B signalisiert. Abschliessend wird K229 durch Wechselwirkungen sowohl mit der Carboxylatgruppe des A-Stellensubstrats als auch mit D139 fixiert und dadurch der Deckel über dem aktiven Zentrum geschlossen. In diesem Zustand, wie er durch Monomer A, der hier gezeigten Struktur, repräsentiert wird, ist das aktive Zentrum für den Start der Kaskade von Reaktionsschritten bereit, die zur Bildung von PBG führt.

Allerdings gibt es zwei bedenkenswerte Unterschiede zwischen dem Komplex PBGS D139N/5F-LA und PBGS/Substrat. D139 ist gegen Asparagin, und die Aminogruppen der Substratmoleküle sind gegen Fluoratome ausgetauscht worden. Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom der funktionellen Gruppe von N139 und dem Fluoratom des Inhibitors in Bindestelle A im Komplex ersetzt dabei wahrscheinlich die Wasserstoffbrücke zwischen D139 und der Aminogruppe von ALA *in vivo*. Die Inhibition der Reaktion durch die unterschiedliche Funktionalität des Inhibitors bei gleichzeitigem Erhalt des Netzwerks hydrophiler Wechselwirkungen ist wahrscheinlich der Grund, warum dieses Substratanalogon überhaupt in der Bindestelle A gefunden werden konnten. Das Substrat in entsprechender, aktivierender Konformation würde sofort abreagieren.

Der Austausch der Aminogruppe gegen Fluor könnte auch die Natur des vorgefundenen monovalenten Kations beeinflusst haben. *In vivo* könnte Kalium, das weniger hart ist als Natrium und daher möglicherweise besser mit der weicheren Aminogruppe harmoniert, an Stelle des Natriumions treten. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die hier dargestellte Struktur erstmalig

eine strukturelle Erklärung für den aktivierenden Effekt monovalenter Kationen auf die Stabilität und Katalyse bieten kann.

4.1.3.2 Der katalytische Mechanismus der Porphobilinogensynthase aus *P. aeruginosa*

Die hier vorgestellte Struktur des Komplexes PBGS-D139N/5F-LA ist der bisher stärkste Beleg für einen katalytischen Mechanismus, der als erste Schritte die Ausbildung zweier Schiffbasenbindungen zwischen beiden Substratmolekülen und den beiden parallel in das aktive Zentrum zeigenden Lysinresten (K205 und K260, *Pa*PBGS) beinhaltet (**Abb. 20**). Energetisch tragen diese Reaktionsschritte vermutlich wenig zur Gesamtbilanz bei, die Bindung in der A-Stelle, stellt wie schon beschrieben, eine Aktivierung dieses Substratmoleküls dar. Der exergonische Teilschritt, der die gesamte Reaktion antreibt, ist die Aromatisierung des Pyrrolringes. Es wurde erwartet, dass dieser sehr schnell abläuft und daher Zwischenprodukte nur vor diesem Schritt gefunden werden könnten. Würde nach der Bindung beider Substratmoleküle die C-N-Bindung geknüpft werden, so entspräche das einem Austausch einer Schiffbasenbindung ($\text{ALA}^{\text{A}}\text{-C3-N}^{\zeta}\text{-Lys205}$) gegen eine andere ($\text{ALA}^{\text{A}}\text{-C3-N5-ALA}^{\text{P}}$), einem Reaktionsschritt ohne nennenswerte thermodynamische Triebkraft. Die Komplexierung der neutralen Aminogruppe des P-Stellensubstrats durch das monovalente Kation erscheint daher eine sinnvolle Maßnahme, um diese Reaktion zurückzudrängen. Wie oben schon beschrieben wurde, zeigen die Konformationen der beiden Inhibitoren, dass das Molekül in der P-Stelle in der Iminiumform vorliegt (**Abb. 13 und 20**), während die Konformation des Inhibitors in der A-Stelle im Einklang mit der Bildung eines Enamins steht. Hierauf aufbauend lässt sich postulieren, dass als erster Schritt der katalysierten Reaktion die Bildung der C-C-Bindung zwischen $\text{ALA}^{\text{A}}\text{-C2}$ und $\text{ALA}^{\text{P}}\text{-C3}$ als klassische Aldolreaktion erfolgt. Die C-C-Verknüpfung ist elektronisch erlaubt und folgt dem Bürgi-Dünitz Winkel für den Angriff eines Enamins auf ein Carbonyl-C-Atom (bzw. hier auf die Schiffbase im P-Stellen-Substrat). Aufgrund der Ausbildung der neuen C-C-Bindung und der damit verbundenen Änderungen der Hybridisierung der beteiligten C-Atome sind konformationelle Änderungen im Zwischenprodukt unausweichlich, wodurch wahrscheinlich die Koordination des monovalenten Kations gestört wird. Der nächste Schritt der Reaktion sollte dann der Austausch der Schiffbasen sein, der zur Bildung der C-N-Bindung und zur Abspaltung des Intermediates von K205 führt (**Abb. 13**).

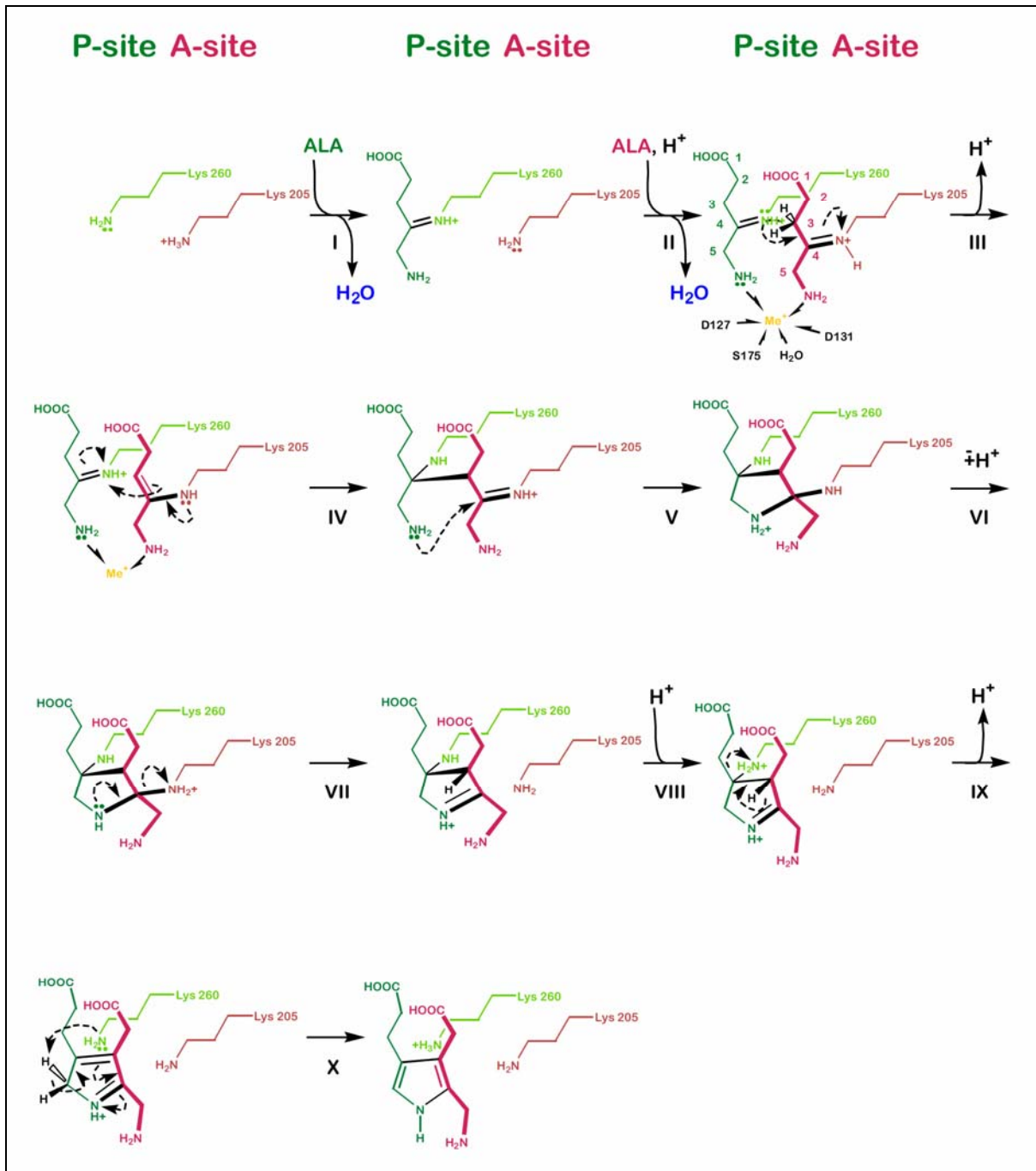


Abb. 20: Der postulierte Mechanismus für PaPBGS. ALA in der P-Stelle ist wiederum grün dargestellt, ALA in der A-Stelle in rot. Die Teilschritte der Kondensationsreaktion sind mit römischen Ziffern durchnummeriert: (I) Bindung ALA in der P-Stelle. (II) Bindung von ALA in der A-Stelle. (III) Abstraktion von H^+ von C3 des A-Stellen-ALA, was zur Ausbildung eines Enamins in der A-Stelle führt. (IV) Aldoladdition wodurch die C-C-Bindung zwischen A- und P-Stellen-ALA. (V-VII) Austausch der Schiff-Basen führt zur Knüpfung der C-N-Bindung zwischen A- und P-Stellen-ALA. (VIII) Transfer von H^+ zu Lys260. (IX) Transeliminierung des P-Stellen-Lysins. (X) Abstraktion des *pro-R*- H^+ von C5 des P-Stellen-ALA, Aromatisierung und Abdiffusion von PBG.

Nachfolgend würde dann die *trans*-Eliminierung der verbliebenen C-N-Bindung zwischen ALA^P -C3-N $^{\zeta}$ -Lys260 erfolgen. Das freigewordene K260 kann dann stereospezifisch das *pro-R*-Proton ⁷⁵ abstrahieren (Schritt X in **Abb. 20**), verbunden mit der Aromatisierung des Pyrrolrings, wodurch das fertige Produkt PBG entsteht. Dieser letzte Schritt ist für die exergoni-

sche Gesamtbilanz verantwortlich und bewirkt dass die dazwischen liegenden Gleichgewichtsreaktionen in Richtung der Produktbildung ablaufen. Das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und Salzbrücken, das den initialen Komplex auszeichnet, ist zerstört worden durch die Zunahme der Hydrophobizität im aktiven Zentrum und die nötigen konformationellen Änderungen infolge der Bildung des aromatischen Produktes. Damit wird auch die Fixierung des Deckels geschwächt und das Produkt kann nach der Lockerung dieser Schleife über dem aktiven Zentrum entweichen.

Die Überlagerung der Strukturen von *Pa*PBGS -D139N/5F-LA mit Hefe PBGS/DOSA zeigt, dass sich das monovalente Kation in der ersten Struktur an einer anderen Stelle im aktiven Zentrum befindet als das Zinkion aus ZnB der zweiten Struktur (**Abb. 21**).

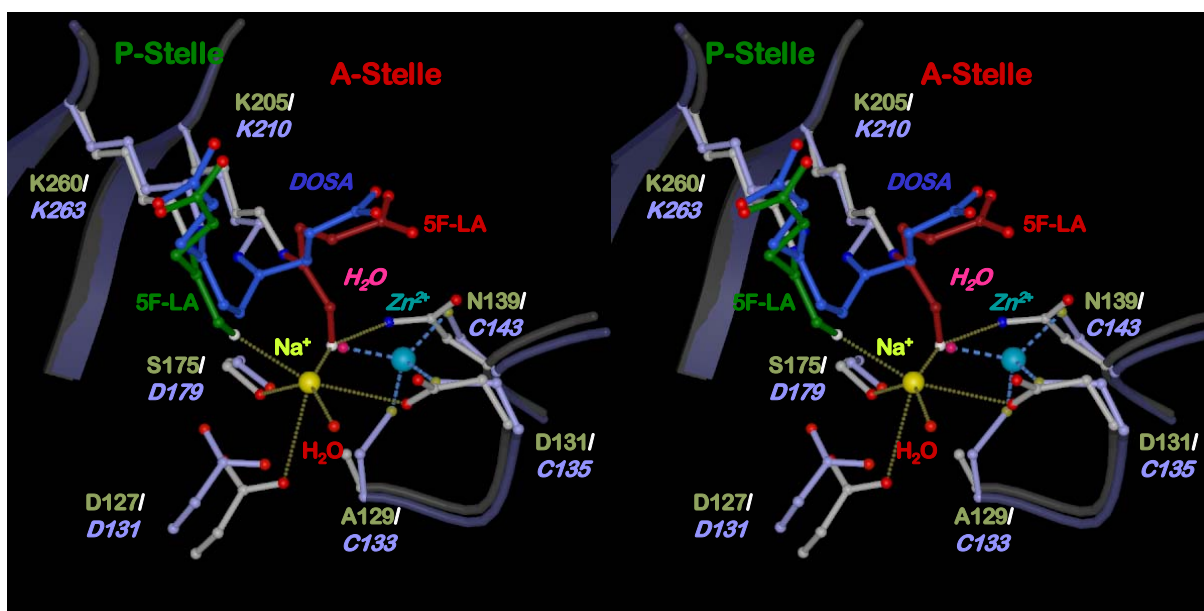


Abb. 21: Aktives Zentrum der PBGS-D139N-Mutante (khaki) im Komplex mit 5F-LA (grün und rot) überlagert dem aktiven Zentrum von Hefe-PBGS (blau) im Komplex mit DOSA (kornblumenblau). Gelbe gepunktete Linien beschreiben hydrophile Wechselwirkungen im ersten Komplex, blaue, gestrichelte Linien beschreiben die Koordination von Zn^{2+} im zweiten Komplex. Fluoratome sind in weiss dargestellt, Schwefelatome in graugelb.

Während sich ZnB am Rande der A-Stelle befindet, ist das Na^+ zwischen den beiden Bindestellen A und P lokalisiert, so dass es von beiden Substratmolekülen koordiniert werden kann. Der Abbildung ist weiterhin zu entnehmen, dass die Position des Fluoratoms des Inhibitors in der A-Stelle äquivalent zu der Position des Wassermoleküls ist, das als vierter Ligand das Zinkion von ZnB in der Struktur des Hefeenzym einnimmt. Diese Position entspricht der Position der Aminogruppe des Produktes PBG im Komplex *Pa*PBGS D139N/PBG (**Abb. 18**). Das weist darauf hin, dass beide Metallionen trotz unterschiedlicher chemischer und elektronischer Natur zumindest im Bezug auf die Stabilisierung von ALA in der A-Stelle stabilisieren eine vergleichbare Aufgabe übernehmen. Das Zn^{2+} könnte jedoch zusätzlich bei der Akti-

vierung des Substrats in der A-Stelle vor der Ausbildung der Schiffbase mit dem zweiten Lysin eine Rolle spielen ⁴⁵.

Zwischenzeitlich sind zwei Veröffentlichungen erschienen, die den von uns teils bewiesenen, teils postulierten Mechanismus untermauern. Die Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit erörterten Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus diesen Veröffentlichungen legt den Schluss nahe, dass sowohl die Porphobilinogensynthase, die Zinkbindestelle ZnB im aktiven Zentrum tragen, als auch solche ohne ZnB einen ähnlichen Mechanismus benutzen ^{83; 84}.

4.2 Evolution der Metallabhängigkeiten in der Familie der Porphobilinogensynthasen

Anknüpfend an die Veröffentlichung des ersten Teils dieser Doktorarbeit⁸⁵ stellte sich die Frage, in wie weit das Vorhandensein der Zinkbindestelle ZnB im aktiven Zentrum von PBGSen aus anderen Organismen (z. B. *E. coli*, Hefe, Mensch) die Katalyse des Enzyms beeinflusst. Da beide Klassen von PBGSen über maximale Umsatzrate auf ähnlichem (langsamem) Niveau verfügen ($k_{\text{cat}} = \text{ca. } 1 \text{ s}^{-1}$) ergab sich daraus als weitere Fragestellung, warum überhaupt verschiedene, sich bezüglich ihrer Komposition an gebundenen Metallionen unterscheidende Klassen von PBGSen existieren und wie diese sich entwickelt haben. **Abbildung 22** gibt eine Übersicht über die verschiedenen Klassen von Porphobilinogensynthasen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde auf der Grundlage der hohen Stabilität und der guten Kristallisierbarkeit der *Pa*PBGS der Versuch unternommen, dieses rein Mg^{2+} -abhängige Enzym in ein Zn^{2+} -bindendes, der *Ec*PBGS analoges Enzym zu verwandeln. Ziel war es, ZnB in das aktive Zentrum einzuführen und die verbliebenen Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum gegenüber *Ec*PBGS zu eliminieren.

4.2.1 Experimenteller Ansatz

Zur Untersuchung der Minimalvoraussetzungen für das Auftreten der Zinkbindestelle B in Porphobilinogensynthasen wurden in *Pa*PBGS drei Aminosäurereste (A129, D131 und D139) gegen Cysteinreste ausgetauscht. Die Reste waren anhand eines strukturellen Alignments zwischen *Ec*PBGS und *Pa*PBGS ausgewählt worden (**Abb. 22**). Mittels ortsgerichteter Mutagenese wurden dabei alle möglichen Varianten von Einfach- und Zweifachmutanten sowie die Dreifachmutante generiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und der Verständlichkeit werden in der Folge für die verschiedenen Varianten von *Pa*PBGS folgende Bezeichnungen gewählt: A129C = CXX, D131C = XCX, D139C = XXC, A129C/D131C = CCX, A129C/D139C = CXC, D131C/D139C = XCC und A129C/D131C/D139C = CCC. Unter den Aminosäureresten, die das Innere des aktiven Zentrums bilden, wurden beim strukturellen Alignment der beiden Strukturen lediglich zwei weitere Reste ausgemacht, die sich unterschieden. Sie entsprechen den Austausch P132E und K229R in *Pa*PBGS. E132 ist teilweise konserviert, R229 hochkonserviert für PBGSen die *in vivo* ZnB tragen (**Abb. 22**).

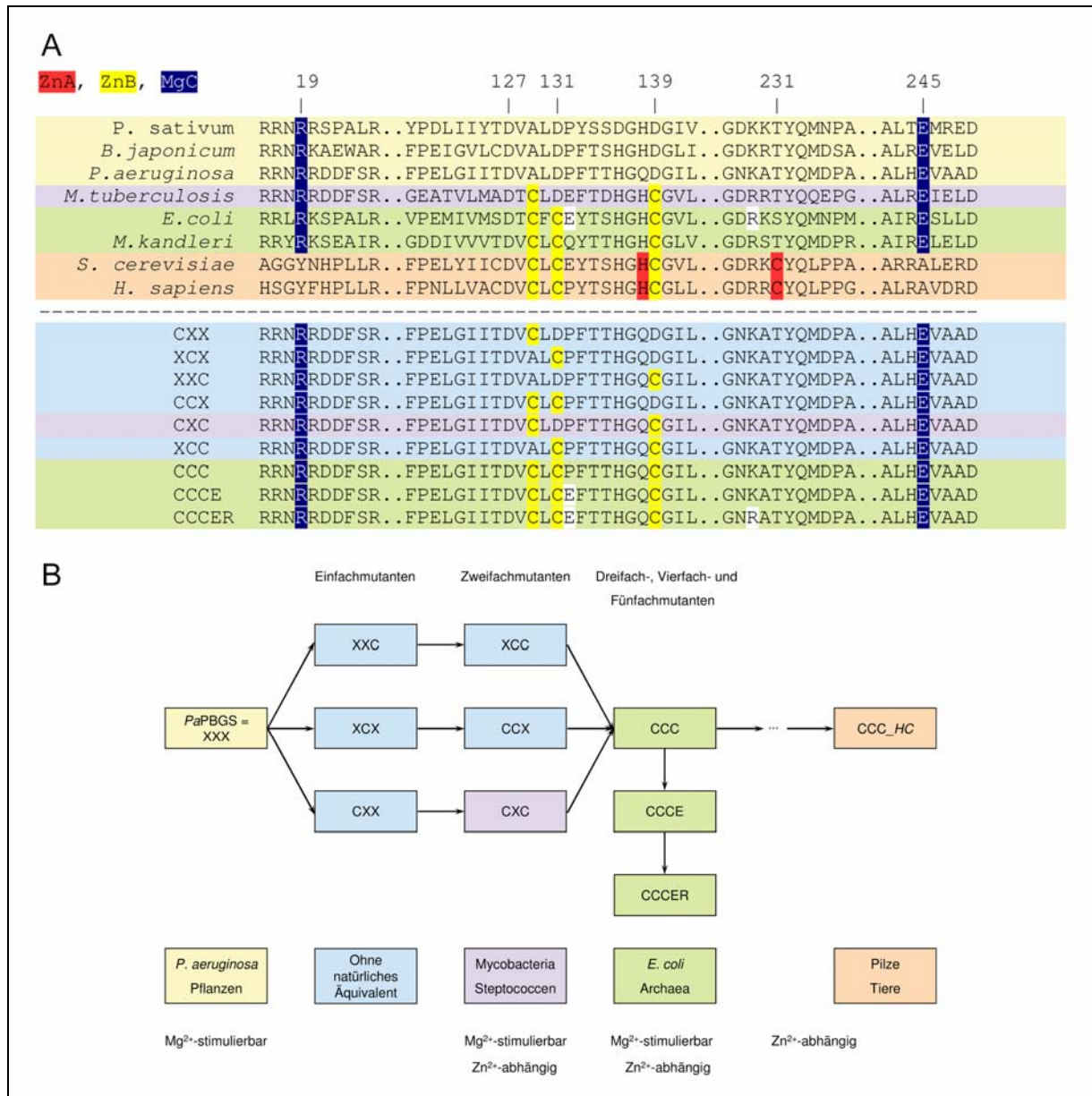
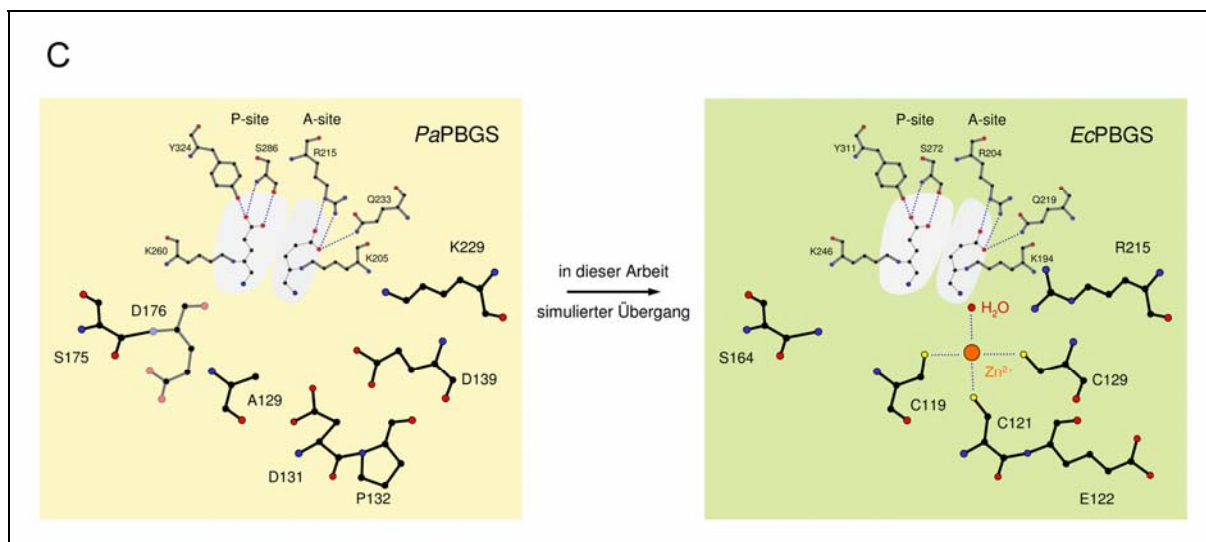


Abb. 22: Experimenteller Ansatz zur Umwandlung der *PaPBGS* in ein Zn²⁺-abhängiges Enzym. A) Sequenzvergleich von natürlich vorkommenden Typen von PBGSen (oberhalb der gestrichelten Linie) und den Varianten von *PaPBGS*. Die Hintergrundfarbe definiert dabei die verschiedenen Prototypen. Rein Mg²⁺-abhängige Enzyme sind gelb hinterlegt, Mg²⁺- und Zn²⁺-bindende Enzyme lila (zwei Cysteine und ein Aspartat in der Bindestelle) oder grün (drei Cysteine in der Bindestelle), während ausschließlich Zn²⁺-bindende PBGSen orange hinterlegt sind. Varianten von *PaPBGS* ohne natürliches Äquivalent sind blau hinterlegt. Die Nummerierung der Aminosäuren basiert auf der Sequenz von *PaPBGS*. Reste, die die Metallbindestellen ZnA, ZnB und MgC ausbilden sind rot, bzw. gelb, oder dunkelblau hinterlegt. Die beiden Aminosäurereste des aktiven Zentrums die sich zwischen *PaPBGS* und *EcPBGS* unterscheiden (132 und 229) sind in Weiß markiert. Die Bezeichnungen für die Mutanten ergeben sich aus einem Code, nach dem das Auftreten eines Cysteins in einer der Positionen 129, 131 und 139 mit einem C beschrieben wird, die Abwesenheit hingegen mit einem X also zum Beispiel CXX für die Mutante A129C. Das Auftreten der Mutationen P132E und K229R wird durch das Anhängen der Buchstaben E bzw. R an diesen Namen angezeigt. B) Schematische Übersicht über die schrittweise Umwandlung von *PaPBGS* in ein Zn²⁺-bindendes Enzym. Die entsprechenden äquivalenten, natürlichen Enzyme sind in der unteren Reihe aufgeführt.



Fortsetzung von **Abb. 22**: Experimenteller Ansatz zur Umwandlung der *Pa*PBGS in ein Zn^{2+} -abhängiges Enzym. C) Schematische Ansicht der aktiven Zentren *Pa*PBGS (gelb) und *Ec*PBGS (grün). Die in dunkelgrau gehaltenen Reste sind für die Bindung der zwei Substratmoleküle verantwortlich (graue gepunktete Linien, basierend auf der Struktur des Komplexes *Pa*PBGS D139N/5F-LA⁸⁵). Die in schwarz dargestellten Reste definieren die Region um ZnB in *Ec*PBGS, beziehungsweise die entsprechende Region in *Pa*PBGS.

Um den möglichen Effekt dieser Aminosäurereste auf die Katalyseeffizienz des ZnB tragenden Hybridenzyms zu testen wurden diese zusätzlich nacheinander in die PBGS Variante CCC eingeführt. Es entstanden die Varianten A129C/D131C/D139C/P132E = CCCE und A129C/D131C/D139C/P132E/K229R = CCCER. Das aktive Zentrum von CCCER entspricht demnach in seiner Aminosäurezusammensetzung exakt demjenigen von *Ec*PBGS. Eine Gruppe von PBGSen aus Streptococcen und Mycobakterien weist bei den ZnB bildenden Aminosäureresten eine Zusammensetzung auf, die genau der Zusammensetzung entspricht, die in der Variante CXC vorkommt (**Abb. 22**). Vertreter dieser Gruppe werden zu den ZnB tragenden PBGSen gerechnet, obschon bisher noch kein Vertreter charakterisiert wurde. Alle neun Mutanten wurden generiert, produziert, kinetisch charakterisiert, kristallisiert, und, so es möglich war, die Struktur aufgeklärt.

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 Zn^{2+} -Bindung und Zn^{2+} -abhängige Enzymaktivität

Die Bindungskonstanten (K_D) und der maximale Zn^{2+} -Gehalt der PBGS-Varianten wurden mittels Gleichgewichtsdialyse in Kombination mit Atomabsorptionsspektroskopie ermittelt. Zusätzlich wurden für die kristallisierbaren Varianten Besetzungszahlen für Zn^{2+} in der Bindestelle B aus den Kristallstrukturen bestimmt (1 mM ZnCl_2 in Kristallisationslösung). Au-

ßerdem wurde ermittelt, ob und in welchem Umfang der Einbau verschiedener Kombinationen von Cysteinresten die enzymatische Aktivität von Zn^{2+} abhängig wird. Dazu wurden die verschiedenen PBGS-Varianten zunächst von zweiwertigen Ionen befreit und dann definierte Mengen von Zn^{2+} zugegeben. Die kinetischen Parameter k_{cat} und K_M wurden beim jeweiligen pH-Optimum des Enzyms bestimmt. Zuvor war bestimmt worden, dass für alle Mutanten, die eine messbare Aktivität zeigten, diese immer noch von der Konzentration an Mg^{2+} -Ionen abhängig war.

Von den drei Einfachmutanten zeigten CXX und XCX keine nachweisbare Affinität zu Zn^{2+} . Gleichzeitig schlugen Kristallisationsversuche bei diesen Enzymen fehl. Die dritte Einzelmutterante XXC bindet Zn^{2+} mit ordentlicher Affinität (**Tab. 6**). Alle drei Einfachmutanten sind enzymatisch inaktiv. Alle drei Doppelmutanten haben signifikante Affinität zu Zn^{2+} . Für XXC, das enzymatisch inaktiv ist, wurde eine Diffusionskonstante von $K_D = 180 \text{ mM}$ für Zn^{2+} und eine maximale Besetzung von 0,3 Zinkionen pro Untereinheit bei sättigenden Bedingungen in Lösung bestimmt. Die beiden Doppelmutanten CCX und CXC (*Mt*PBGS-artig) zeigten eine Zn^{2+} -abhängige Aktivität von ca. 3,6 bzw. 2,4 % der *Pa*PBGS.

Die drei Enzymvarianten, die drei Cysteine in den entsprechenden Positionen tragen, (CCC, CCCE und CCCER) binden Zn^{2+} mit den höchsten Affinitäten und maximalen Besetzungszahlen von 0,44 (CCCE) bis 0,57 (CCC) pro Untereinheit (**Tab.6**) in Lösung. Der K_D -Wert von $7 \mu\text{M}$ für CCCE ist dabei auf dem Niveau von *Ec*PBGS ($6 \mu\text{M}$ ⁸⁶). Die Extraktion mit 10 mM EDTA war nicht vollständig für CCC, CCCE und CCCER, weshalb auch bei niedrigsten Konzentrationen Zinkionengehalte von ca. 0,2 Zn^{2+} pro Monomer nachweisbar waren. Die maximalen Besetzungszahlen, die durch die Gleichgewichtsdialyse bestimmt wurden sind generell niedriger, als diejenigen, die für die entsprechenden Kristallstrukturen ermittelt wurden (**Tab. 6**). Diese Unterschiede wurden bereits früher für andere PBGSen beschrieben und sind wahrscheinlich auf den grundsätzlich verschiedenen Aufbau der Experimente zurückzuführen. CCC und CCCER sind bereits bei Zn^{2+} -Konzentrationen unter $10 \mu\text{M}$ aktiv, während CCCE seine maximale Aktivität bei $50 \mu\text{M}$ erreicht. CCC ist unter den dreien die am wenigsten aktive Variante mit ca. 5 % Aktivität im Vergleich zur Aktivität von *Pa*PBGS. CCCE und CCCER hingegen erreichen schon 15 % bzw. 33 % der *Pa*PBGS-Aktivität. Offenbar zeigten nur die Varianten eine signifikante Aktivität, die eine Entsprechung zu natürlich vorkommenden PBGSen aufweisen.

Tab. 6: Zusammenfassung der strukturellen und biochemischen Eigenschaften der Varianten von *Pa*PBGS

	ZnB Auftreten, Form	Besetzung im Kristall Mon A Mon B	K_D für Zn^{2+} [μ M] ^a	Zn^{2+} -Besetzung in Lösung pro Monomer	k_{cat} [s^{-1}] K_{Mapp} [mM]	k_{cat}/K_{Mapp} [$s^{-1} \cdot M^{-1}$]	Aktivierung durch Mg^{2+} Zn^{2+} ^c	pH-Optimum
<i>Pa</i> PBGS	-	-	n. b.	n. b.	0,84	2100	+ -	8,5
CXX	keine Kristallstruktur	-	> 10000	n. b.	< 0,001 % ^b	-	- -	n. b.
XCX	keine Kristallstruktur	-	n. b.	n. b.	< 0,001 % ^b	-	- -	n. b.
XXC	+ verzerrt	0,5 0,5	302	0,44	< 0,001 % ^b	-	- -	n. b.
CCX	+ verzerrt	0,7 0,7	860	0,31	0,03 1,69	17,8	+ (+) ^f	8,0
XCC	+ verzerrt	0,5 0,5	180	0,29	< 0,001 % ^b	-	- -	n. b.
CXC "M/PBGS"	+ tetraedrisch	0,9 0,9	450	0,59	0,02 2,18	9,2	+ +	7,5
CCC	+ tetraedrisch	1,0 0,9	78	0,57	0,044 0,24	183,3	+ +	7,6
CCCE	+ tetraedrisch	0,85 0,85	7	0,56	0,12 0,12	1000	+ +	8,5
CCCER	+ tetraedrisch	0,85 0,85	85	0,44	0,29 1,20	241,7	+ +	8,8
<i>Ec</i> PBGS	+ tetraedrisch	1,0 1,0	6 ^d	n. m.	0,68 0,1 ^e	4700	+ +	8,2

n. b.: nicht bestimmbar;
^a: Fehler liegen zwischen 10 und 50 % des jeweiligen Wertes
^b: Vergleichen mit der Aktivität von WT *Pa*PBGS
^c: + steht für Aktivierbarkeit durch das Metall, - steht für keine feststellbare Aktivität unter den Bedingungen der Rekonstitution,
^d: aus Spencer *et al.* ⁸⁶,
^e: aus ⁴²,
^f: merkliche Aktivität bei gleichzeitiger Mg^{2+} -Konzentration von 5 mM

Die einzige Ausnahme zu dieser Regel stellt CCX. Für diese Mutante ist zurzeit noch kein natürliches Gegenstück in der PBGS-Familie bekannt. Allerdings benötigte dieses Enzym auch hohe Mengen an Mg^{2+} (5 mM), um seine Aktivität zu entfalten. Möglicherweise fängt das Mg^{2+} in seiner Funktion als allosterische Aktivator hier strukturelle Instabilitäten im Bereich des aktiven Zentrums/ZnB auf.

Zwei Trends lassen sich aus den kinetischen Parametern ableiten. Von den enzymatisch aktiven Varianten von *Pa*PBGS haben die Doppelmutanten CCX und CXC die geringste Aktivität (k_{cat}). Die *Ec*PBGS-artigen Mutanten CCC, CCCE und CCCER sind aktiver. Die Zn^{2+} -abhängige Enzymaktivität korreliert offensichtlich mit dem Grad der Annäherung der Architektur des aktiven Zentrums der *Pa*PBGS-Varianten an *Ec*PBGS.

4.2.2.2 Kristallstrukturen der neuen Varianten von *Pa*PBGS

Von den neun *Pa*PBGS-Mutanten ergaben sieben röntgentaugliche Kristalle, für CXX und XCX scheiterten hingegen alle Versuche entsprechende Kristalle zu züchten. Die Strukturen wurde ebenfalls durch Differenzfouriersynthese aufgeklärt, wobei die Struktur von WT *Pa*PBGS als Modell diente³⁵. Sie wurde mit sinnvollen kristallografischen und stereochemischen Parametern bis zu Auflösungen zwischen 1,40 (CCCER) und 2,20 (XXC) Å verfeinert (**Tab. 7**). Alle relevanten Parameter sind in **Tabelle 7** zusammengefasst, sie liegen alle in den jeweilig sinnvollen Bereichen.

Alle Varianten behalten die übergeordnete, von *Pa*PBGS bekannte Faltung bei, Unterschiede beschränkten sich auf einzelne Aminosäurereste oder kurze Bereiche. Mit steigender Zahl eingeführter Mutationen verringert sich überraschenderweise auch die Asymmetrie zwischen den beiden Untereinheiten. CCCER entspricht daher auch in dieser Hinsicht seiner „Verwandten“, *Ec*PBGS, die ebenfalls eine deutlich niedrigere Asymmetrie als *Pa*PBGS aufweist. Im Folgenden wird daher zwischen Monomer A und B nur unterschieden, wenn signifikante Unterschiede zwischen den aktiven Zentren der beiden Monomere eines Enzyms zu verzeichnen waren. Die aktiven Zentren der Mutanten XXC, CCX (Monomer A und B) und XCC sind in **Abb. 23** und **24** dargestellt. In allen Fällen war in geringer Distanz zu den Resten 126, 131 und 139 Elektronendichte vorhanden, die sich am besten durch Zn^{2+} in Besetzungen unter 1,0 beschreiben lässt. Cysteinereste, Carboxylgruppen der Asparaginsäurereste und Wassermoleküle als Liganden bilden in allen Fällen eine verzerrte tetraedrische Koordinationssphäre um das Metallion. In der Mutante CCX nimmt D139 zwei alternative Konformationen ein.

Tab. 7: Kristallographische Daten

<i>Strukturaufklärung</i>	XXC	CCX	XCC	CXC	CCC	CCCE	CCCCER
Raumgruppe	P4 ₂ ,2	P4 ₂ ,2	P4 ₂ ,2	P4 ₂ ,2	P4 ₂ ,2	P4 ₂ ,2	P4 ₂ ,2
Zellachsen: a; b; c (Å)	125.2; 125.2; 86.0	126.3; 126.3; 85.6	125.3; 125.3; 85.8	126.3; 126.3; 85.2	127.0; 127.0; 85.4	127.0; 127.0; 86.4	125.7; 125.7; 85.5
Gesamtzahl der Reflexe ^a einmalige Reflexe	442530 35228	328504 75220	440803 81768	583843 90595	857583 59936	661937 101482	1270070 132918
Auflösungsbereich (Å) ^b	47.1 – 2.20 (2.28 – 2.20)	20.0 – 1.70 (1.76 – 1.70)	20.0 – 1.65 (1.71 – 1.65)	20.0 – 1.60 (1.63 – 1.60)	20.0 – 1.85 (1.88 – 1.85)	20.0 – 1.55 (1.61 – 1.55)	20.0 – 1.40 (1.45 – 1.40)
Vollständigkeit (%) ^b	99.8 (99.5)	98.5 (98.0)	99.4 (99.0)	99.9 (100)	100 (100)	99.0 (99.0)	99.3 (100)
Redundanz ^b	12.6 (11.8)	4.3 (4.3)	5.4 (5.1)	6.4 (6.1)	14.3 (14.6)	6.7 (6.2)	9.6 (9.5)
R _{merge} ^b	10.1 (44.6)	5.2 (32.8)	4.7 (36.0)	5.0 (27.8)	9.9 (31.3)	8.1 (49.9)	5.8 (56.3)
I/σ _I ^b	23.1 (5.3)	17.8 (3.2)	20.5 (3.1)	32.7 (5.5)	29.6 (9.3)	16.0 (3.8)	27.9 (5.7)
Temperaturfaktor (Å ²)	30.4	20.8	20.8	15.7	21.5	19.6	15.6

^a: > 1 σ
^b: Wert für die Schale höchster Auflösung in Klammern
^c: R_{merge} = 100 (Σ_{h, i} ||I_{h, i} - I_i| / Σ_{h, i} I_{h, i}), wobei die Summe aller Observationen I_{h, i} gebildet wird, die zur Reflexintensität I_h beitragen.

Fortsetzung von **Tab. 7**: Kristallographische Daten

Verfeinerung	XXC	CCX	XCC	CXC	CCC	CCCE	CCCC
Für die Verfeinerung verwendeter Auflösungsbereich (Å) ^d	87.7 – 2.2	87.7 – 1.7	87.7 – 1.65	87.7 – 1.60	87.7 – 1.85	87.7 – 1.5	87.7 – 1.4
Anzahl verwendeter Reflexe ^a	33396	71529	76946	85549	56718	94390	123617
Proteinatome ohne H / Dimer	5297	5503	5444	5542	5299	5354	5392
Wassermoleküle / Dimer	304	693	627	887	654	532	619
Ionen / Dimer : Na ⁺ ; K ⁺ ; Mg ²⁺ ; Zn ²⁺ ; Cl ⁻	-; 2; 2; 2; -	-; 2; 3; 2; -	2; -; 3; 2; 1	-; -; 7; 2; 2;	-; 2; 2; 2; -	-; 2; 2; 2; -	2; -; 5; 2; -
durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	30.84	18.92	19.90	14.20	20.09	18.15	16.30
R-Faktor (%); R _{free} (%) ^e	15.38; 21.69	13.80; 18.16	15.06; 18.77	12.92; 16.49	13.14; 17.56	15.73; 18.51	14.68; 17.28
Ramachandran Plot ^f ; bevorzugte Region; zusätzlich erlaubte Region; (%)	93.0; 7.0	93.5; 6.3	93.6; 6.4	93.2; 6.8	93.2; 6.5	93.3; 6.7	94.0; 6.0
Mittlere Abweichung von Idealwerten für: Bindungslängen (Å); Bindungswinkel (deg.) ^g	0.026; 2.028	0.025; 2.16	0.027; 2.146	0.024; 2.094	0.024; 2.038	0.015; 1.628	0.025; 2.074
Geschätzter mittlerer Koordinatenfehler, basierend auf der höchsten Wahrscheinlichkeit (Å)	0.12	0.05	0.04	0.06	0.06	0.04	0.03
PDB code	1w54	1w56	1w5m	1w5n	1w5o	1w5p	1w5q

^a: > 1 σ
^d: F_c für den Bereich 87.71-20.0 Å.
^e: 5% der Daten wurden abgetrennt zur Berechnung von R_{free}⁶⁹
^f: berechnet mit Procheck₇₀
^g: berechnet mit Whatif⁷¹

Im Monomer B werden beide Konformationen beobachtet, während im Monomer A nur eine der beiden eingenommen wird. In letztgenannter Konformation nimmt die Carboxylgruppe des Restes nicht an der Koordination des Zinkions teil, sondern weist vom zentralen Zinkatom weg. Die zweite Konformation der Aminosäure in Monomer B, die aus einer Rotation der Carboxylgruppe um 90 ° resultiert ist hier jedoch in die Koordination des Zinkions mit einbezogen.

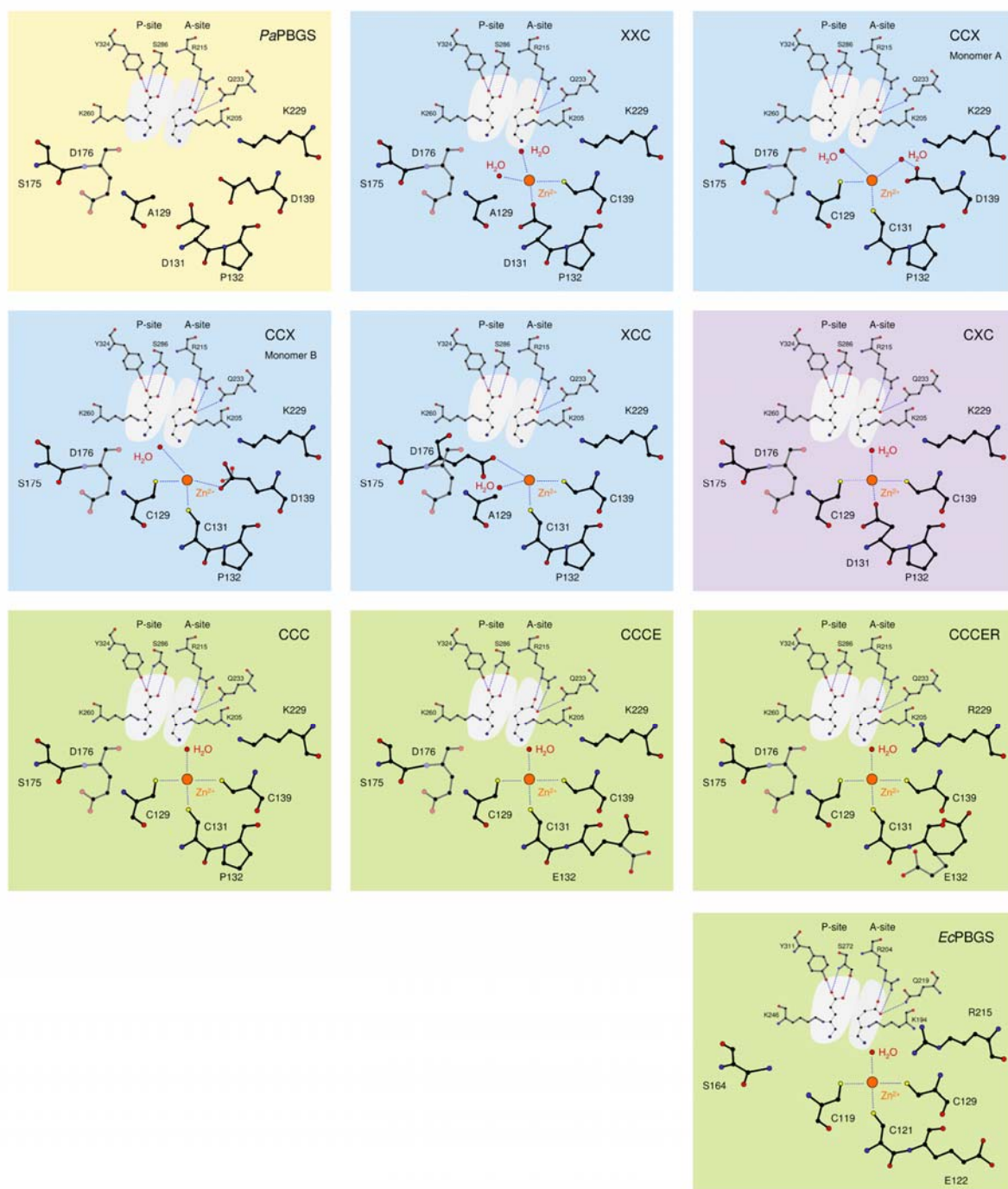


Abb. 23: Die Schematische Darstellung der aktiven Zentren von *PaPBGS*, den generierten Varianten, sowie *EcPBGS* beschreibt den schrittweisen Übergang von *PaPBGS* zu einem Zn^{2+} -bindenden, *EcPBGS*-ähnlichen Enzym. Der Farbcode für die Aminosäurereste und den Hintergrund entspricht dem in **Abb. 22**

Legt man die Kristallisationsbedingungen von 1 mM Zinkchlorid zugrunde, so war die Besetzung mit Zn^{2+} in der Zinkbindestelle B der beiden Strukturen von XXC und CCX mit 0,7 recht gering. Bei XCC war eine noch geringere Besetzung von 0,5 zu beobachten. Ausschließlich in dieser Variante von *Pa*PBGS nimmt D176 aus einem Loop in Nachbarschaft zu ZnB eine zweite Konformation ein, die es seiner Carboxylgruppe erlaubt, das Zn^{2+} zusätzlich zu C131, C139 und einem Wassermolekül zu koordinieren.

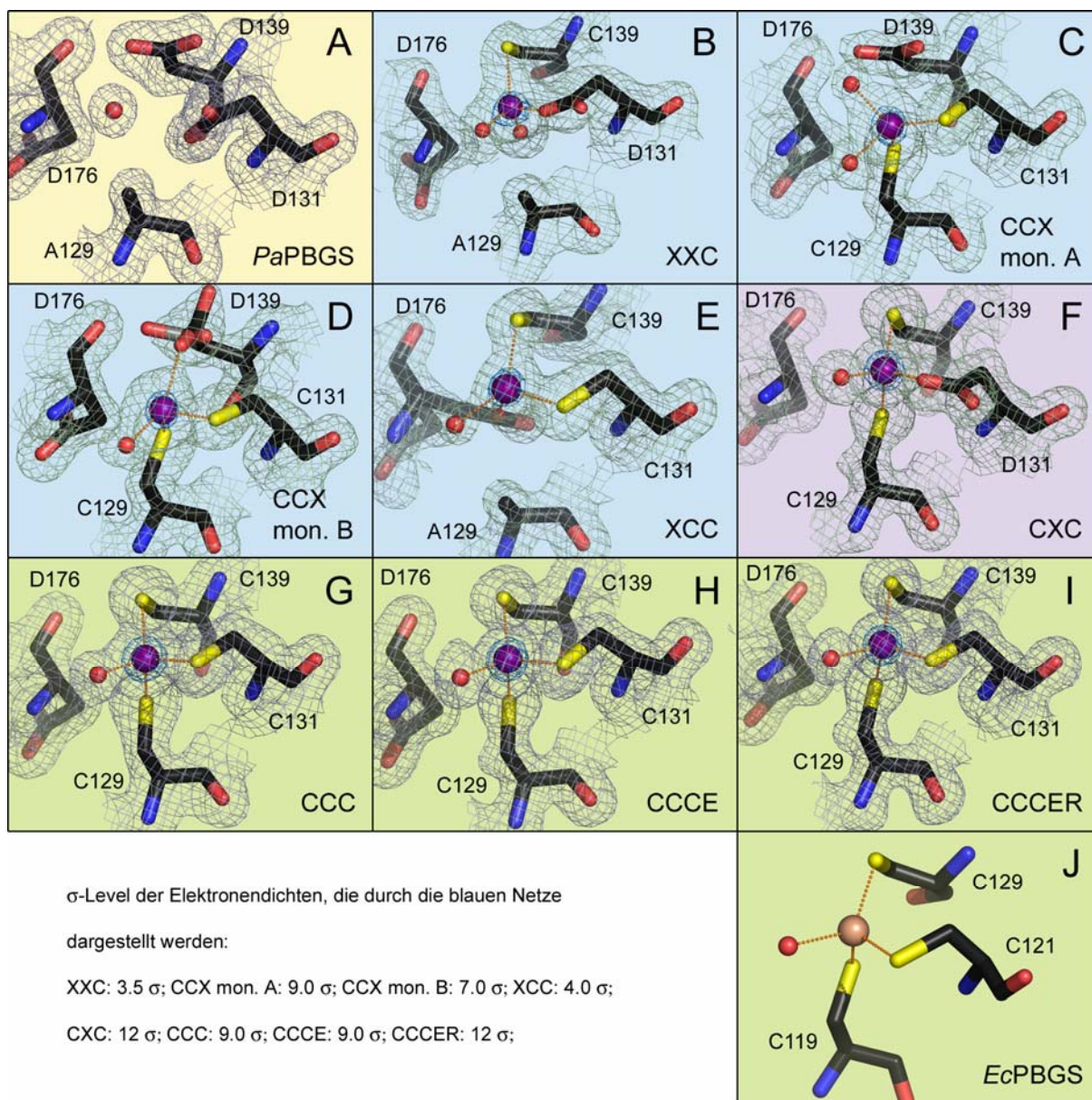


Abb. 24: Übersicht über den Aufbau der Metallbindestelle ZnB in *Ec*PBGS (grüner Hintergrund), *Pa*PBGS (gelber Hintergrund) und den Varianten von *Pa*PBGS (blauer, grüner oder violetter Hintergrund). Die endgültigen $2F_o - 2F_c$ -Elektronendichten sind konturiert bei 1,0 σ (graue Netze), und bei hohen σ -Werten (blaue Netze), wodurch die Position der Zinkionen beschrieben wird. Die hohen σ -Werte wurden variiert, abhängig von der Besetzungszahl für das Zinkion und der maximalen Auflösung des jeweiligen Datensatzes. Die roten Kugeln beschreiben Positionen von Wassermolekülen, die lilafarbenen, bzw. orangen Kugeln die Positionen der Zinkionen. Orange, gepunktete Linien verbinden die Zinkionen mit ihren Koordinationspartnern. Der Farbcode für die Hintergründe folgt dem Schema aus **Abb. 22**.

Nichtsdestotrotz ist auch in diesem Fall die tetraedrische Koordinationssphäre des Zinkions stark verzerrt. Alle oben beschriebenen Strukturen zeigen, dass die Einführung von ein oder zwei Aminosäureresten in den entsprechenden Positionen die Ausbildung einer Zinkbindestelle induziert. Die entstehenden Bindestellen für das Zinkion sind jedoch in ihrer Geometrie nicht optimal, sondern im Gegenteil stark verzerrt. Dem entsprechen die niedrigen Besetzungszahlen für Zink in diesen Strukturen. Zudem sind diese Enzyme inaktiv mit Ausnahme von CCX, das eine Restaktivität von 3 % verglichen mit *Pa*PBGS aufweist.

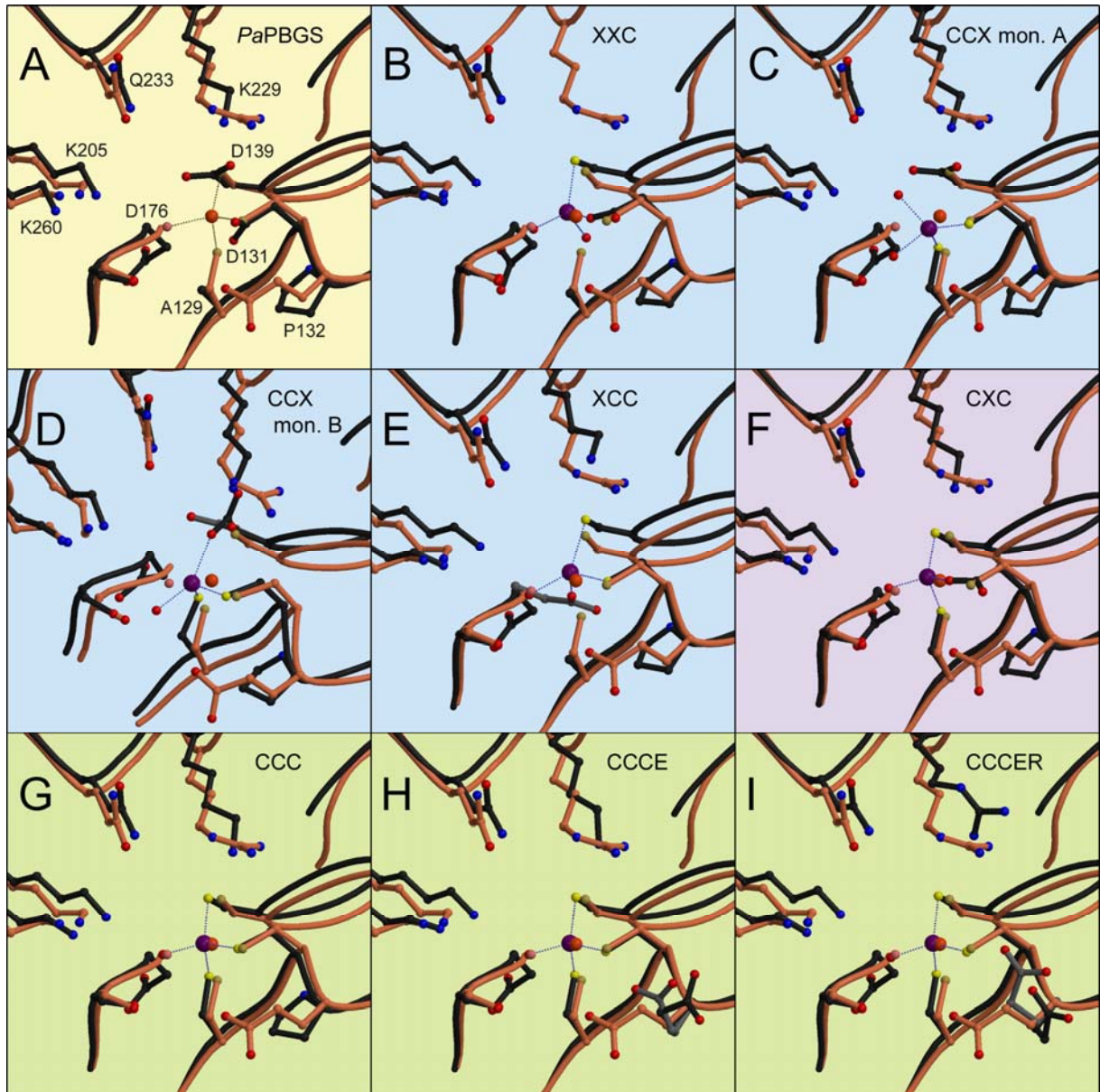


Abb. 25: Zusammenfassung der aktiven Zentren von *Pa*PBGS und den Varianten (dunkelgrau) jeweils überlagert mit dem aktiven Zentrum von *Ec*PBGS (orange). Die roten Kugeln beschreiben Positionen von Wassermolekülen, die lilafarbenen (*Pa*PBGS und Varianten), bzw. orangen Kugeln (*Ec*PBGS) die Positionen der Zinkionen. Blaue, gepunktete Linien verbinden die lilafarbenen Zinkionen mit ihren Koordinationspartnern. Der Farbcode für die Hintergründe folgt dem Schema aus **Abb. 22**.

Die Superposition dieser Strukturen mit *Ec*PBGS in **Abb. 25** verdeutlicht die Verzerrungen in den Koordinationssphären und die damit verbundenen Verschiebungen des Zinkions relativ zur Proteinmatrix. Die aktiven Zentren der Mutanten, für die es in der Zusammensetzung der ZnB-bildenden Reste Entsprechungen in der Familie der PBGSen gibt, (CXC entspricht *Mt*PBGS, CCC, CCCE, CCCER entsprechen *Ec*PBGS) sind ebenfalls in **Abb. 23** und **24** dargestellt. Diese Mutanten verbinden eine jeweils nahezu perfekte Geometrie der Koordinationssphäre des Zinkions mit hohen Besetzungszahlen für das jeweilige Zn^{2+} ($\sim 0,85 - 1,0$). Alle koordinierenden Reste nehmen ausschließlich eine Konformation ein. Die Überlagerungen dieser Strukturen mit *Ec*PBGS in **Abb. 25** unterstreichen den erfolgreichen Transfer der Zn^{2+} -Bindestelle ZnB in das aktive Zentrum von *Pa*PBGS. Durch CXC konnte damit zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die natürlich vorkommenden Enzyme mit einer entsprechenden Zusammensetzung der Aminosäuren in den relevanten Positionen fähig sind eine geometrisch vorteilhafte Zinkbindestelle auszubilden. In Übereinstimmung mit den strukturellen Informationen zeigen diese vier Mutanten signifikante, Zn^{2+} -abhängige Enzymaktivitäten. In der Mutante CCCE wurde zusätzlich zum Einbau von ZnB auch noch der Rest P132 gegen ein Glutamat ausgetauscht. P132 liegt in dem Loop, der auch die Reste 129 und 131 trägt und befindet sich in Reichweite von Aminosäureresten aus dem N-terminalen Bereich der Schlaufe die als Deckel das aktive Zentrum verschließt. Bevor P132 mutiert wurde, wurde anhand des strukturellen Alignments verifiziert, dass für ein Glutamat genügend Platz ist an dieser Stelle. Auch die Aminosäuren die direkte Wechselwirkungspartner für das entsprechende Glutamat in *Ec*PBGS darstellen sind in *Pa*PBGS konserviert und liegen an identischen Positionen. Überraschenderweise nimmt dieser Rest in den beiden Hybridenzymen CCCE und CCCER in je zwei Konformationen ein, die beide bezüglich der Positionen von Cy und der Carboxylgruppe von der in *Ec*PBGS gefundenen abweichen. Gleichzeitig ist der Deckel in diesen beiden Strukturen in jeweils beiden Monomeren ungeordnet und somit offen, was möglicherweise mit der leichten Unordnung durch E132 in der Nähe der N-terminalen Region dieser Schlaufe zusammenhängt. Beide Enzyme, in denen dieser Rest eingeführt wurde, zeigten außerdem eine deutlich höhere maximale Aktivität als der „Vorläufer“ CCC. Möglicherweise kann dieser Rest im Gegensatz zu Prolin, als zusätzlicher Akzeptor und Donor für eine der vielen Protonierungs- bzw. Deprotonierungsschritte im Verlauf der Katalyse dienen oder aber der Deckel über dem aktiven Zentrum wird durch diese Veränderung in der Nähe seines N-terminus labilisiert, so dass er in diesen Mutanten weniger lokalisiert ist und daher das Substrat bzw. das Produkt leichter zu- bzw. abdiffundieren können.

Der Austausch K229R erhöht die maximale Aktivität des Hybridenzyms um den Faktor 2. Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass dieses Arginin für alle ZnB tragenden PBGSen konserviert ist. Offensichtlich ist eine weitere Erhöhung der Basenstärke für diesen Rest in ZnB tragenden PBGSen für die Katalyse förderlich. In CCCER steht dem Arginin außerdem D139 nicht mehr als Wechselwirkungspartner zur Verfügung (**Abb. 23** und **25**). Da außerdem die Struktur von CCCER ohne Zusatz von Substrat oder Produkt kristallisiert wurde, fehlt dem Arginin auch sein zweiter möglicher Wechselwirkungspartner in Form der Carboxylgruppe von Substrat bzw. Produkt. Folglich ist R229 in CCCER schlecht geordnet und in seiner Position gegenüber K229 in *Pa*PBGS etwas verschoben. Parallel steigt der K_{Mapp} gegenüber CCCE um den Faktor 10 an, was wahrscheinlich auf diese Störungen in der Bindestelle A zurückzuführen ist. Möglicherweise fördert dieser Austausch gemeinsam mit D139C eine weiteren Labilisierung der Deckelregion.

4.2.3 Diskussion

4.2.3.1 Vergleich der Varianten von *Pa*PBGS

Die dargelegten Untersuchungen wurden unternommen, um die Funktion der Zinkbindestelle ZnB in Porphobilinogensynthasen weiter aufzuklären, sowie den möglichen evolutionären Weg zu beschreiben der zwischen *Pa*PBGS (rein Mg^{2+} -abhängigen PBGS) und *Ec*PBGS (Mg^{2+} - und Zn^{2+} -abhängigen PBGS) liegt. Der Austausch von lediglich drei Aminosäureresten im aktiven Zentrum war hinreichend, um diese Änderung der Metallabhängigkeiten zu induzieren. Der Austausch zweier weiterer Resten führte zu einem Hybridenzym, dass in einer Reihe von Charakteristika dem Zielenzym, *Ec*PBGS, weitgehend angenähert war. Zusätzlich wurde in dieser Studie die Mutante CXC in ihrer Struktur und ihren kinetischen Parametern beschrieben. Sie kann als Äquivalent gelten für eine Unterklasse von PBGSen (*Mt*PBGS), die zuvor schon in die Gruppe der Mg^{2+} - und Zn^{2+} -abhängigen PBGSen eingegliedert worden war, aus der jedoch noch kein Vertreter charakterisiert worden war. Diese Unterklasse liegt, betrachtet man die ZnB-bildenden Aminosäurereste, zwischen den rein Mg^{2+} -abhängigen und den *E. coli*-artigen PBGSen. CXC ist enzymatisch aktiv und Zn^{2+} -abhängig, was darauf schließen lässt, dass *Mt*PBGS und verwandte PBGSen ebenfalls Zn^{2+} -abhängig sind. Das wird vor allem auch durch die Kristallstruktur dieser Mutante gestützt, denn als einzige der generierten Doppelmutanten verfügt sie über eine Zinkbindestelle mit nahezu perfekter tetraedrischer Koordinationssphäre und hoher Besetzung für das Zinkion. Von den neun generierten Mutanten haben fünf kein Gegenstück in der Familie der natürlich vorkommenden PBGSen. Dies sind CXX, XCX, XXC CCX und XCC. Alle diese Mutanten sind inaktiv außer CCX. Von CXX und XCX konnten in sämtlichen Kristallisationsversuchen keine röntgentauglichen Kristalle erhalten werden. XXC und XCC weisen eine mäßige Affinität zu Zn^{2+} auf, ihre Zinkbindestellen fallen jedoch auf durch erhebliche Verzerrungen gegenüber der idealen Tetraederanordnung. Das führt in diesen beiden Mutanten zu Verschiebungen des Zinkions relativ zum Proteinrückgrat im Vergleich zu ZnB in *Ec*PBGS oder *Sc*PBGS. In der einzigen aktiven der „nicht natürlichen“ Varianten von *Pa*PBGS, CCX, fällt ebenfalls eine starke Verzerrung der Koordinationssphäre der Zinkbindestelle B mit einer erniedrigten Besetzungszahl für das Zn^{2+} zusammen. Die Zn^{2+} -abhängige Aktivität dieser Mutante entwickelt sich interessanterweise auch erst bei Mg^{2+} -Konzentrationen oberhalb von 5 mM, weshalb sie nicht eindeutig in die Reihe der Zn^{2+} -abhängigen PBGSen einzureihen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Struktur der *Pa*PBGS Stabilität mit Plastizität verbindet, so dass verschiedene Metallabhängigkeiten durch den Austausch weniger Aminosäurereste variiert werden können. Betrachtet man die gesamte Familie der PBGSen, so scheint dieses Prinzip die Grundvoraussetzung zu sein für die vielfältigen unterschiedlichen Metallabhängigkeiten, die in dieser Enzymfamilie beobachtet werden.

Die Ergebnisse stehen überwiegend im Einklang mit den Ergebnissen von Cauham *et al.*⁸⁷, die bei ihren Untersuchungen ZnB durch ortsgerichtete Mutagenese in einem Schritt in die ausschließlich Mg^{2+} abhängige *Bradyrhizobium japonicum* PBGS transferiert hatten. Die Funktionalität *in vivo* wurde durch Komplementationsversuche nachgewiesen, bei denen das Hybridenzym die natürliche PBGS ersetzte. Nach rekombinanter Produktion des Enzyms in *E. coli* konnten sie in zellfreien Extrakten zwar Zn^{2+} -abhängige PBGS-Aktivität, jedoch keine von Mg^{2+} -Ionen abhängige Aktivität nachweisen. Dies ist insofern überraschend, als bei diesem Enzym die allosterische Mg^{2+} -Bindestelle MgC unangetastet blieb.

4.2.3.2 Evolution der Porphobilinogensynthasen

Auf der Grundlage der funktionellen und strukturellen Untersuchungen an den neun cystein-haltigen Mutanten von *Pa*PBGS wurde ein möglicher Weg der Evolution zwischen rein Mg^{2+} -abhängigen und *E. coli*-artigen Zn^{2+} - und Mg^{2+} -abhängigen Porphobilinogensynthasen postuliert. Zwei Variationen der Zinkbindestelle B wurden durch die Mutation nur von zwei (CXC) bzw. drei (CCC) Aminosäureresten erfolgreich in *Pa*PBGS eingeführt. Die generierten Bindestellen stimmten sowohl in Lokation als auch in ihrer Geometrie mit dem Vorbild aus *Ec*PBGS überein. Die Generierung einer Metallbindestelle in einer beliebigen Leitstruktur ist aber normalerweise ein höchst sensibler Prozess⁸⁸. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass in einem potentiellen, gemeinsamen, zinkfreien Vorläufer der heutigen PBGSen die Anordnung aller Reste in der entsprechenden Region um A129, D131 und D139 zufällig in der optimalen Konformation vorgelegen haben, so dass der Austausch von zwei bzw. drei Aminosäureresten zur Ausbildung von Zinkbindestellen mit nahezu perfekt tetraedrischer Koordination zu führt wie es in CXC und CCC beobachtet wurde. Da es darüber hinaus weder zu Überlagerung dieser Bindestelle mit der direkt angrenzenden Substratbindestelle A kommt, noch Anpassungen des Peptidrückgrats zur Realisation dieser neuen Metallbindestelle notwendig sind unterstützen die Ergebnisse vielmehr die Theorie die erstmalig von Jaffe *et al.*⁷⁸ formu-

liert wurde, wonach sich die Zn^{2+} -unabhängigen PBGS-Spezies aus einem Zn^{2+} -abhängigen Vorläufer entwickelt haben.

Neben *P. aeruginosa* besitzen außerdem Pflanzen, phototrophe Bakterien wie die *Rhodobacteriaceae* und pflanzenassoziierte Bakterien wie *Bradyrhizobien* Zn^{2+} -unabhängige PBGSen. Es ist bekannt, dass die Gegenwart von Zn^{2+} durch Konkurrenz die Insertion von Mg^{2+} in das Porphyringrundgerüst bei der Reifung von Chlorophyll unterbinden kann⁷⁸. Die Entwicklung der Photosynthese könnte daher den evolutionären Druck geliefert haben, der nötig wäre, die Verwendung von Zn^{2+} in diesem Organismus und in diesem besonderen Fall in PBGS einzuschränken.

Eine mögliche Route zur Entwicklung Zn^{2+} -freier PBGSen verläuft via Genduplikation, gefolgt von der parallelen Evolution zweier verschiedener PBGSen im selben Organismus. Diese These wird unterstützt durch das Auftreten zweier, direkt hintereinander angeordneter Gene in dem Cyanobakterium *Nostoc PC 7120*⁷⁸, die für je eine PBGS aus der Familie der *EcPBGS*-artigen sowie aus der Familie der *PaPBGS*-artigen kodieren. Nicht auszuschließen ist auch die Möglichkeit, dass sich die Entwicklung über ein Zn^{2+} -abhängiges Enzym mit lediglich zwei Cysteinresten, wie zum Beispiel in *MtPBGS*, vollzogen hat. Nachfolgend würde eine allerdings recht seltene Doppelmutation zu einer cysteinfreien und damit Zn^{2+} -unabhängigen Mutante geführt haben können. Zusätzlich wäre auch eine Kombination beider Szenarien denkbar.

4.2.3.3 Die Funktion von ZnB

Die Einführung von ZnB bei gleichzeitigem Erhalt der Aktivität der *PaPBGS* kann als Erfolg gewertet werden, der so nicht zwangsläufig zu erwarten war, angesichts der Größe und der sterischen Anforderungen dieser Zinkbindestelle. Dass dies trotzdem möglich war, ist ein Hinweis darauf, dass sich die Reaktionsmechanismen der katalysierten Umsetzung für beide Formen der PBGSen nicht grundsätzlich voneinander unterscheiden. Diese These wird durch die Gestalt des Reaktionsintermediates gestützt, das in der Struktur von *EcPBGS* gefunden wurde⁸⁴ und durch den in dieser Arbeit postulierten Mechanismus bereits vorhergesagt wurde. Setzt man also voraus, dass sich die Mechanismen nicht essentiell unterscheiden, verwundert es, dass die Varianten CXC – CCCER durch die Einführung von ZnB in ihrer Aktivität zinkabhängig werden. Betrachtet man **Abb. 18**, dann lässt sich dieser Befund so interpretieren, dass das Zinkion in ZnB hauptsächlich die Aufgabe hat, die Aminogruppe von Substrat,

Reaktionsintermediat und Produkt zu orientieren und zu fixieren. In *Pa*PBGS koordinieren der Rest D139 direkt und die Reste D127, D131 und S175 indirekt über das monovalente Kation diese Aminogruppe durch hydrophile Wechselwirkungen anstatt durch Metall-Ligand-Wechselwirkungen. Diese Reste sind in der Klasse Zn^{2+} -freier PBGSen konserviert. Was diese Reste jedoch nicht leisten können, ist die Aktivierung des Substrats durch Wechselwirkung seiner Carbonylfunktion mit dem Zinkion bei der Ausbildung der Schiffbasenbindung mit K205, wie dies für ZnB in *E. coli* vorgeschlagen worden war⁴⁵. Eine solche zusätzliche Aktivierung des Substrats könnte eine Erklärung darstellen für die bessere Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{Mapp}}$ von *Ec*PBGS im Vergleich zu *Pa*PBGS.

Der Übergang zwischen verschiedenen Typen von PBGSen lässt sich also recht leicht bewerkstelligen. Allerdings sind eine Reihe von weiteren Optimierungen nötig, wie die im Vergleich zu *Pa*PBGS und *Ec*PBGS erniedrigte Aktivität unserer Hybridenzyme zeigt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Porphobilinogensynthasen katalysieren die asymmetrische Kondensation von zwei Molekülen ALA zum Monopyrrol PBG und sind damit integraler Bestandteil im Biosyntheseweg von Tetrapyrrolen. Im ersten Teil dieser Arbeit konnten durch die erfolgreiche Kristallisation des Enzyms im Komplex mit dem Inhibitor 5-Flourlävulinsäure die Struktur des mit Substrat beladenen Enzyms zum Zeitpunkt des Starts der Katalyse, sowie die ersten Schritte im Reaktionsverlauf modelliert werden. Ein Reaktionsmechanismus wurde formuliert, der von nachfolgenden Untersuchungen anderer Gruppen bestätigt wurde^{83; 84}. Dieser Reaktionsmechanismus beinhaltet Aktivierung des Substrats in der A-Stelle in Form eines Enamins und die Bildung der C-C-Bindung als erstem Reaktionsschritt. Er schließt die Beteiligung eines monovalenten Kations ein, wodurch zum ersten Mal eine mechanistische Beschreibung für den aktivierenden Effekt, den diese Metallionen auf die Katalyse mancher PBGSen haben, gegeben wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, den potentiellen evolutorischen Übergang zwischen rein Mg^{2+} -abhängigen und gemischt Mg^{2+} - und Zn^{2+} -abhängigen PBGSen *in vitro* nachzuverfolgen. Es sollten dabei Einblicke in die Funktion der Metallbindestelle ZnB gewonnen werden. Dazu wurde diese Bindestelle in das aktive Zentrum von *Pa*PBGS durch schrittweisen Austausch der Reste A129, D131 und D139 gegen Cysteine integriert. Der Vergleich der dabei generierten sieben Mutanten anhand ihrer kinetischen Parameter sowie ihrer Strukturen identifizierte zwei Mutanten, die eine deutliche Zn^{2+} -abhängige Aktivität aufwiesen. Diese beiden Mutantenzymen besaßen Zinkbindestellen mit unverzerrter Koordinationsgeometrie, eine hohe Besetzung mit Zn^{2+} und eine einheitliche Konformation der koordinierenden Aminosäurereste. Außerdem sind diese beiden Mutanten die einzigen, für die äquivalente PBGSen in der Natur vorkommen. Zwei weitere Mutationen, die das aktive Zentrum der Dreifachmutanten weiter an das von *Ec*PBGS annäherten (P132E und K229R), führten zu einer Verbesserung der Aktivität der so modifizierten Enzyme. Die erfolgreiche Integration der Zinkbindestelle in *Pa*PBGS bei gleichzeitigem Erhalt der Enzymaktivität lässt darauf schließen, dass das Zinkion an keinem der integralen Schritte der Katalyse beteiligt ist, sondern an der Bindung und Orientierung von Substrat-, Intermediat- und Produktmolekülen. Eine Evolution von Zn^{2+} -freier PBGS aus Zn^{2+} -abhängiger PBGS wird abgeleitet.

5.2 Ausblick

Für eine weitergehende, detaillierte Aufklärung des Enzymmechanismus bietet sich an, kinetische Untersuchungen mit Inhibitoren an *Pa*PBGS, *Ec*PBGS und den Varianten CCC, CCCE und CCCER durchzuführen. Durch den Vergleich der verschiedenen Enzyme sollten weitere Rückschlüsse auf die späteren Reaktionschritte möglich sein. Hiermit ließe sich die Bedeutung von ZnB für die Katalyse endgültig klären.

Im Bezug auf die Evolution der Metallabhängigkeiten ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit zwei Fragestellungen. In welchem Umfang müssen weitere Mutationen eingefügt werden, um CCCER in ein Enzym zu verwandeln, das wirklich in allen Kriterien *Ec*PBGS entspricht, und welcher Art müssen diese Mutationen sein? Ein möglicher Ansatz wäre hier gerichtete Evolution an CCCER durchzuführen mit dem Ziel einer Verbesserung der kinetischen Effizienz.

Bei der Lösung der Kristallstruktur der Mutanten CCCE und CCCER bei hohen Auflösungen konnten in der Kontaktstelle zwischen den Dimeren im Oktamer weitere Bindestellen für Mg^{2+} -Ionen identifiziert werden. Für PBGSen aus anderen Organismen war anhand von Bindungsstudien das Vorhandensein einer weiteren Mg^{2+} -Bindestelle postuliert worden, die allerdings im aktiven Zentrum lokalisiert sein sollte. Hier sollte untersucht werden, in wie weit die von uns neu entdeckten Bindestellen in den verschiedenen PBGSen konserviert sind und ob sich mit ihrer Existenz die Daten aus den obengenannten Bindungsstudien erklären lassen.

6 Literaturverzeichnis

1. Jahn, D., Hungerer, C. & Troup, B. (1996). [Unusual pathways and environmentally regulated genes of bacterial heme biosynthesis]. *Naturwissenschaften* **83**, 389-400.
2. Shoolingin-Jordan, P. M. & Cheung, K. M. (1999). Biosynthesis of heme. In *Comprehensive natural products chemistry* Barton D. edit. (Kelly, J. W., ed.), Vol. **4**, pp. 61-103. 9 vols. Elsevier Science Ltd, Amsterdam.
3. Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J. & Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 275-85.
4. Finke, R. G. (1988). Coenzyme B₁₂-based chemical precedent for Co-C bond homolysis and other key elementary steps. In *Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins*. (Kräutler, B., Arigoni, D. & Golding, B. T., eds.), pp. 383-402. Wiley/VCH, Weinheim.
5. Braslavsky, S. E., Gärtner, W. & Schaffner, K. (1997). Phytochrome photoconversion. *Plant Cell Environ* **20**, 700-706.
6. Ishida, T., Yu, L., Akutsu, H., Ozawa, K., Kawanishi, S., Seto, A., Inubushi, T. & Sano, S. (1998). A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in *Desulfovibrio vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4853-8.
7. Roth, J. R., Lawrence, J. G. & Bobik, T. A. (1996). Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* **50**, 137-81.
8. Jahn, D., Verkamp, E. & Soll, D. (1992). Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem Sci* **17**, 215-8.
9. Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. & Jahn, D. (1999). *Methanopyrus kandleri* glutamyl-tRNA reductase. *J Biol Chem* **274**, 30679-85.
10. Moser, J., Schubert, W. D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2001). V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO* **20**, 6583-90.
11. Moser, J., Schubert, W. D., Heinz, D. W. & Jahn, D. (2002). Structure and function of glutamyl-tRNA reductase involved in 5-aminolaevulinic acid formation. *Biochem Soc Trans* **30**, 579-84.
12. Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Malashkevich, V. N., Hädener, A., Warren, M. J. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1996). The three-dimensional structure of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase at 1.76-Å resolution. *Proteins* **25**, 48-78.

13. Mathews, M. A., Schubert, H. L., Whitby, F. G., Alexander, K. J., Schadick, K., Bergonia, H. A., Phillips, J. D. & Hill, C. P. (2001). Crystal structure of human uroporphyrinogen III synthase. *EMBO* **20**, 5832-9.
14. Phillips, J. D., Whitby, F. G., Kushner, J. P. & Hill, C. P. (2003). Structural basis for tetrapyrrole coordination by uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO* **22**, 6225-33.
15. Layer, G., Verfurth, K., Mahlitz, E. & Jahn, D. (2002). Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 34136-42.
16. Layer, G., Moser, J., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W. D. (2003). Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. *EMBO* **22**, 6214-24.
17. Breckau, D., Mahlitz, E., Sauerwald, A., Layer, G. & Jahn, D. (2003). Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is stimulated by manganese. *J Biol Chem* **278**, 46625-31.
18. Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R. & Messerschmidt, A. (2004). Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO* **23**, 1720-8.
19. Dzikaite, V., Hultcrantz, R. & Melefors, O. (2003). The regulatory effect of heme on erythroid aminolevulinate synthase in natural erythroid cells. *Biochim Biophys Acta* **1630**, 19-24.
20. Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. & von Wettstein, D. (1996). Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9287-91.
21. Wang, L., Wilson, S. & Elliott, T. (1999). Conditional stability of the Hema Protein (Glutamyl-tRNA Reductase) regulates heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 1211-19.
22. Wang, L., Wilson, S. & Elliott, T. (1999). A mutant Hema protein with positive charge close to the N terminus is stabilized against heme-regulated proteolysis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 6033-41.
23. Schobert, M. & Jahn, D. (2002). Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 287-94.
24. Krieger, R., Rompf, A., Schobert, M. & Jahn, D. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* hemA promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. *Mol Genet Genomics* **267**, 409-17.

25. Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M., Romling, U., Gross, U., Doss, M. O., Arai, H., Igarashi, Y. & Jahn, D. (1998). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* hemF and hemN by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol* **29**, 985-97.
26. Homuth, G., Rompf, A., Schumann, W. & Jahn, D. (1999). Transcriptional control of *Bacillus subtilis* hemN and hemZ. *J Bacteriol* **181**, 5922-9.
27. Wijayanti, N., Katz, N. & Immenschuh, S. (2004). Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem* **11**, 981-6.
28. Hoffman, M., Gora, M. & Rytka, J. (2003). Identification of rate-limiting steps in yeast heme biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 1247-53.
29. Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2003). Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *Rna* **9**, 1084-97.
30. Gross, U., Hoffmann, G. F. & Doss, M. O. (2000). Erythropoietic and hepatic porphyrias. *J Inherit Metab Dis* **23**, 641-61.
31. Lermontova, I., Kruse, E., Mock, H. P. & Grimm, B. (1997). Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8895-900.
32. Erskine, P. T., Norton, E., Cooper, J. B., Lambert, R., Coker, A., Lewis, G., Spencer, P., Sarwar, M., Wood, S. P., Warren, M. J. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1999). X-ray structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* complexed with the inhibitor levulinic acid at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **38**, 4266-76.
33. Erskine, P. T., Senior, N., Awan, S., Lambert, R., Lewis, G., Tickle, I. J., Sarwar, M., Spencer, P., Thomas, P., Warren, M. J., Shoolingin-Jordan, P. M., Wood, S. P. & Cooper, J. B. (1997). X-ray structure of 5-aminolaevulinate dehydratase, a hybrid aldolase. *Nat Struct Biol* **4**, 1025-31.
34. Frankenberg, N., Heinz, D. W. & Jahn, D. (1999). Production, purification, and characterization of a Mg²⁺-responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **38**, 13968-75.
35. Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999). High resolution crystal structure of a Mg²⁺-dependent porphobilinogen synthase. *J Mol Biol* **289**, 591-602.

36. Frankenberg, N., Jahn, D. & Jaffe, E. K. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* contains a novel type V porphobilinogen synthase with no required catalytic metal ions. *Biochemistry* **38**, 13976-82.
37. Jarret, C. (1999). Etude de la porphobilinogen synthase d'*E. coli*: Inhibitions selectives des deux sites actifs. PhD Thesis, Université de Neuchâtel.
38. Henz, M. (1997). Inhibitionsstudien zum Mechanismus der Porphobilinogensynthase, isoliert aus *E. coli* CR 261. PhD Thesis, Université de Neuchâtel.
39. Reardon, D. & Faber, G. K. (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* **9**, 497-503.
40. Erskine, P. T., Newbold, R., Roper, J., Coker, A., Warren, M. J., Shoolingin-Jordan, P. M., Wood, S. P. & Cooper, J. B. (1999). The Schiff base complex of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase with laevulinic acid. *Protein Sci* **8**, 1250-6.
41. Jaffe, E. K. (1995). Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 169-79.
42. Senior, N. M., Brocklehurst, K., Cooper, J. B., Wood, S. P., Erskine, P., Shoolingin-Jordan, P. M., Thomas, P. G. & Warren, M. J. (1996). Comparative studies on the 5-aminolaevulinic acid dehydratases from *Pisum sativum*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **320** (Pt 2), 401-12.
43. Mitchell, L. W. & Jaffe, E. K. (1993). Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II). *Arch Biochem Biophys* **300**, 169-77.
44. Petrovich, R. M., Litwin, S. & Jaffe, E. K. (1996). *Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase uses two Mg(II) and monovalent cations. *J Biol Chem* **271**, 8692-9.
45. Kervinen, J., Jaffe, E. K., Stauffer, F., Neier, R., Wlodawer, A. & Zdanov, A. (2001). Mechanistic basis for suicide inactivation of porphobilinogen synthase by 4,7-dioxosebacic acid, an inhibitor that shows dramatic species selectivity. *Biochemistry* **40**, 8227-36.
46. Frankenberg, N., Kittel, T., Hungerer, C., Romling, U. & Jahn, D. (1998). Cloning, mapping and functional characterization of the hemB gene of *Pseudomonas aeruginosa*, which encodes a magnesium-dependent 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Mol Gen Genet* **257**, 485-9.
47. Nandi, D. L. & Shemin, D. (1968). Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*. III. Mechanism of porphobilinogen synthesis. *J Biol Chem* **243**, 1236-42.

48. Frere, F. (2000). Substraterkennung durch die Porphobilinogen-Synthase aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diploma Thesis, Albert-Ludwigs-Universität.
49. Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-9.
50. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
51. Frankenberg, N. (1999). Die Mg^{2+} -abhängige Porphobilinogen Synthase aus *Pseudomonas aeruginosa*. Doctoral Thesis, Albert-LudwigsUniversität.
52. Reents, H. (2002). Proteinengineering zur gezielten Veränderung der Metallabhängigkeit der Porphobilinogen-Synthase aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diploma Thesis, Technische Universität Braunschweig.
53. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Liquid media for *E. coli*. In *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edit., Vol. **3**, pp. A2.2. 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
54. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.
55. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Spectrophotometry of DNA or RNA. In *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edit., Vol. **3**, pp. A8.20 - A8.21. 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
56. Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
57. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
58. Righetti, P. G., Gianazza, E., Gelfi, C. & Chairi, M. (1990). In *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* 2nd edit. (Hames, B. D. & Rickwood, D., eds.), pp. 149-214. Oxford University Press, Oxford.
59. Mauzenrall, D. & Granik, S. (1956). The occurrences and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* **219**, 435-446.
60. Copeland, R. A. (1996). Dose-response curves of enzyme inhibition. In *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (Copeland, R. A., ed.), pp. 204-209. Wiley-VCH, New York.
61. McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

62. Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography* **30**, 211-237.
63. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In *Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A* (Carter, C. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. **276**, pp. 307-326. Academic Press, New York.
64. Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-3.
65. French, S. & Wilson, K. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallographica Section A* **34**, 517-525.
66. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A Foundations of Crystallography* **47**, 110-119.
67. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, R. W., W., G.-K. R., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54** (Pt 5), 905-921.
68. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53** (Pt3), 240-255.
69. Brünger, A. T. (1992). Free *R*-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
70. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26** (Pt 2), 283-291.
71. Hoof, R. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* **381**, 272.
72. Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins, Vol. **23**, pp. 283-438, New York.
73. Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 946-950.
74. Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* **50**, 869-873.

75. Erskine, P. T., Newbold, R., Brindley, A. A., Wood, S. P., Shoolingin-Jordan, P. M., Warren, M. J. & Cooper, J. B. (2001). The x-ray structure of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase complexed with substrate and three inhibitors. *J Mol Biol* **312**, 133-41.
76. Spencer, P. & Jordan, P. M. (1995). Characterization of the two 5-aminolaevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem J* **305** (Pt 1), 151-8.
77. Erskine, P. T., Coates, L., Newbold, R., Brindley, A. A., Stauffer, F., Wood, S. P., Warren, M. J., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M. & Neier, R. (2001). The X-ray structure of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase complexed with two diacid inhibitors. *FEBS Lett* **503**, 196-200.
78. Jaffe, E. K. (2003). An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem Biol* **10**, 25-34.
79. Kervinen, J., Dunbrack, R. L., Jr., Litwin, S., Martins, J., Scarrow, R. C., Volin, M., Yeung, A. T., Yoon, E. & Jaffe, E. K. (2000). Porphobilinogen synthase from pea: expression from an artificial gene, kinetic characterization, and novel implications for subunit interactions. *Biochemistry* **39**, 9018-29.
80. Petrovich, R. M. & Jaffe, E. K. (1997). Magnetic resonance studies on the active site and metal centers of *Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase. *Biochemistry* **36**, 13421-7.
81. Cheung, K. M., Spencer, P., Timko, M. P. & Shoolingin-Jordan, P. M. (1997). Characterization of a recombinant pea 5-aminolevulinic acid dehydratase and comparative inhibition studies with the *Escherichia coli* dehydratase. *Biochemistry* **36**, 1148-56.
82. Nandi, D. L. & Shemin, D. (1968). Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides*. II. Association to polymers and dissociation to subunits. *J Biol Chem* **243**, 1231-5.
83. Goodwin, C. E. & Leeper, F. J. (2003). Stereochemistry and mechanism of the conversion of 5-aminolevulinic acid into porphobilinogen catalysed by porphobilinogen synthase. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1443 - 1446.
84. Erskine, P. T., Coates, L., Butler, D., Youell, J. H., Brindley, A. A., Wood, S. P., Warren, M. J., Shoolingin-Jordan, P. M. & Cooper, J. (2003). X-ray structure of a putative reaction intermediate of 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* **373**, 733–738.

85. Frere, F., Schubert, W. D., Stauffer, F., Frankenberg, N., Neier, R., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2002). Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluorolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism. *J Mol Biol* **320**, 237-47.
86. Spencer, P. & Jordan, P. M. (1993). Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. *Biochem J* **290** (Pt 1), 279-87.
87. Chauhan, S. & O'Brian, M. R. (1995). A mutant *Bradyrhizobium japonicum* delta-aminolevulinic acid dehydratase with an altered metal requirement functions in situ for tetrapyrrole synthesis in soybean root nodules. *J Biol Chem* **270**, 19823-7.
88. Regan, L. (1995). Protein design: novel metal-binding sites. *Trends Biochem Sci* **20**, 280-5.

7 **Anhänge**

Anhang 1:

Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluorolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism.

(Frere, F. *et al.*, 2002, *J Mol Biol*, **320**, 237-47)

Structure of Porphobilinogen Synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in Complex with 5-Fluorolevulinic Acid Suggests a Double Schiff Base Mechanism

Frederic Frère¹, Wolf-Dieter Schubert², Frédéric Stauffer³
Nicole Frankenberg⁴, Reinhard Neier³, Dieter Jahn¹ and
Dirk W. Heinz^{2*}

¹Institute of Microbiology
Technical University
Braunschweig
Spielmannstrasse 7, D-38106
Braunschweig, Germany

²Department of Structural
Biology, German Research
Center for Biotechnology
Mascheroder Weg 1, D-38124
Braunschweig, Germany

³Institut de Chimie, Université
de Neuchâtel, Av. Bellevaux 51
Case postale 2, CH-2007
Neuchâtel 7, Switzerland

⁴Section of Molecular &
Cellular Biology, University of
California Davis, One Shields
Avenue, Davis, CA 95616
USA

All natural tetrapyrroles, including hemes, chlorophylls and vitamin B₁₂, share porphobilinogen (PBG) as a common precursor. Porphobilinogen synthase (PBGS) synthesizes PBG through the asymmetric condensation of two molecules of aminolevulinic acid (ALA). Crystal structures of PBGS from various sources confirm the presence of two distinct binding sites for each ALA molecule, termed A and P. We have solved the structure of the active-site variant D139N of the Mg²⁺-dependent PBGS from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with the inhibitor 5-fluorolevulinic acid at high resolution. Uniquely, full occupancy of both substrate binding sites each by a single substrate-like molecule was observed. Both inhibitor molecules are covalently bound to two conserved, active-site lysine residues, Lys205 and Lys260, through Schiff bases. The active site now also contains a monovalent cation that may critically enhance enzymatic activity. Based on these structural data, we postulate a catalytic mechanism for *P. aeruginosa* PBGS initiated by a C–C bond formation between A and P-side ALA, followed by the formation of the intersubstrate Schiff base yielding the product PBG.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

*Corresponding author

Keywords: porphobilinogen synthase; *Pseudomonas aeruginosa*; crystal structure; 5-fluorolevulinic acid; enzyme–inhibitor complex

Introduction

The first common step in the ubiquitous biosynthesis of all tetrapyrroles is catalyzed by the enzyme porphobilinogen synthase (PBGS, EC 4.2.1.24, or 5-aminolevulinic acid dehydratase). PBGS asymmetrically condenses two molecules of 5-aminolevulinic acid (ALA) to produce the pyrrole-derivative porphobilinogen (PBG, Figure 1). The two ALA substrate molecules are distinguished as A and P-side-ALA due to the acetic

acid and propanoic acid side-chains that they contribute to the product. The corresponding binding sites of PBGS are termed A-site and P-site, respectively.

The synthesis of PBG requires the sequential formation of both a C–C bond and a C–N bond between the substrate molecules. The C–C bond is formed by an aldol condensation; the C–N bond by a Schiff base. Consequently, two catalytic mechanisms are possible with respect to the order of these bond formations (Figure 1). Both possibilities have been discussed frequently.^{1–4}

PBGSs are metalloenzymes.^{5–10} Bacterial enzymes either exclusively contain Mg²⁺ or both Mg²⁺ and Zn²⁺, plant enzymes contain only Mg²⁺, while mammalian enzymes are generally Zn²⁺-dependent. Additionally, some Mg²⁺-containing

Abbreviations used: ALA, 5-aminolevulinic acid; DOSA, 4,7-dioxosuccinic acid; 5F-LA, 5-fluorolevulinic acid; PBG, porphobilinogen; PBGS, porphobilinogen synthase; WT, wild-type.

E-mail address of the corresponding author: dih@gbf.de

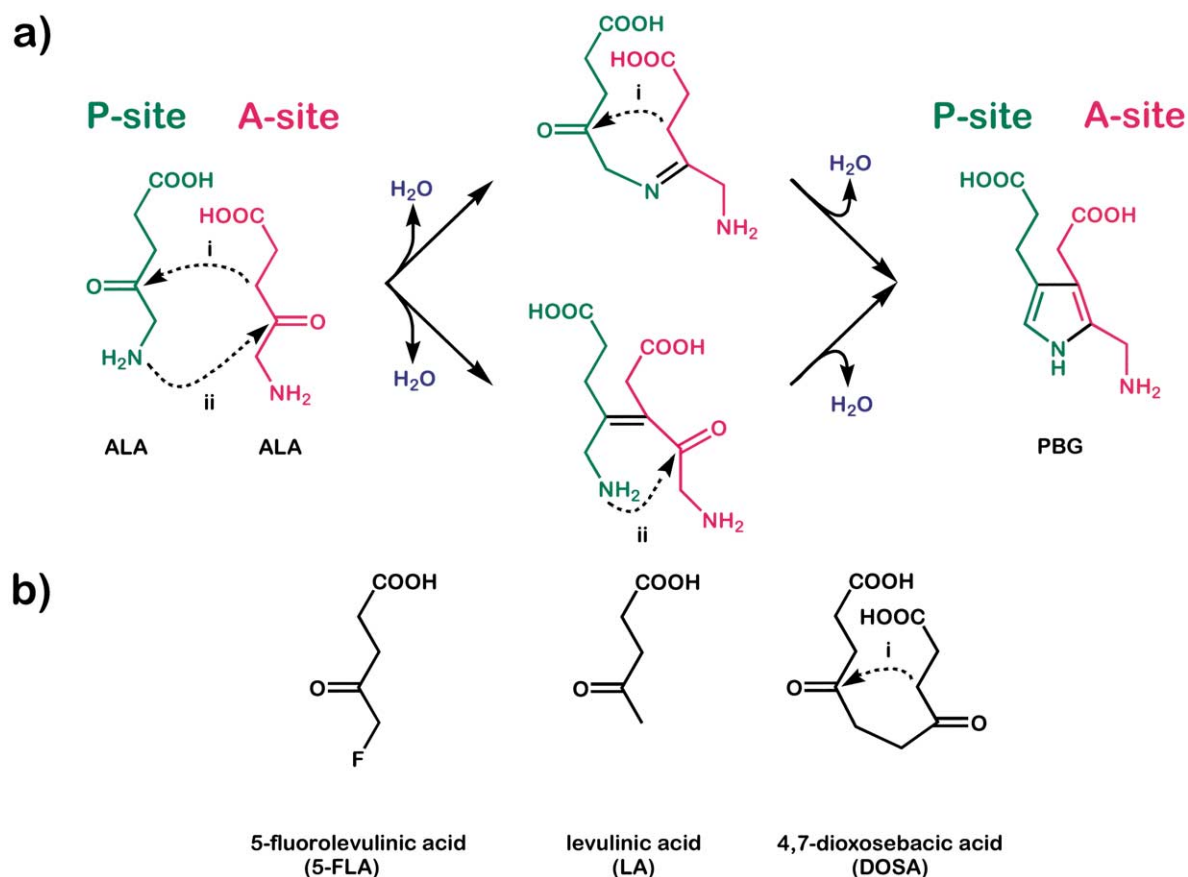


Figure 1. (a) Catalytic reaction of PBGS. Two ALA molecules are asymmetrically condensed to form PBG. Two new bonds (i) C–C and (ii) C–N are formed in the process. Two intermediates are possible, depending on the sequence of the reaction steps. (b) Inhibitors of PBGS (from left to right): 5-fluorolevulinic acid (5F-LA), levulinic acid (LA) and 4,7-dioxosebacic acid (DOSA).

bacterial enzymes are further activated by monovalent cations.^{5,11,12}

The crystal structures of PBGS from *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*

and *Escherichia coli* reveal a homo-octameric enzyme composed of four dimers arranged around a central 4-fold axis.^{2,4,9,13,14} The extended N-terminal arm of each monomer closely wraps

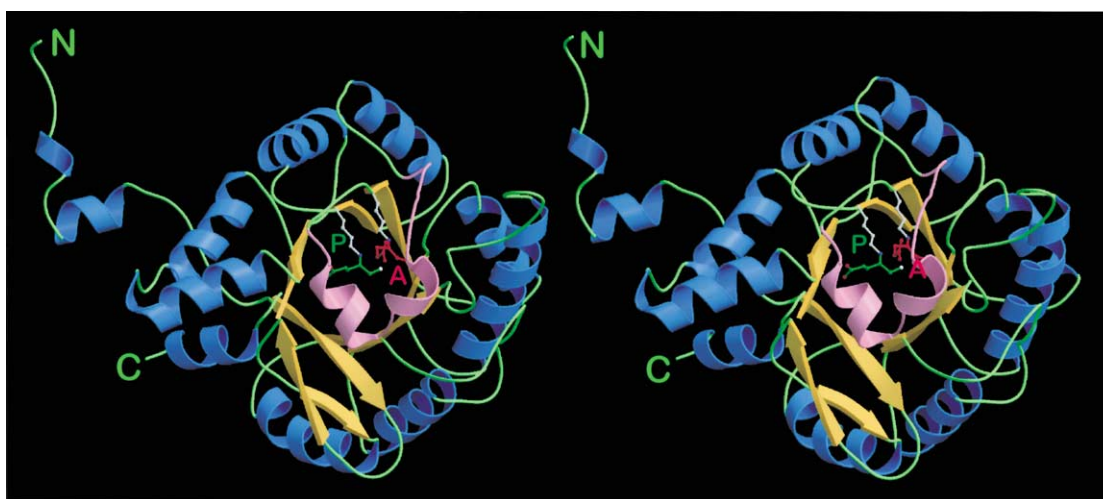


Figure 2. Stereographical representation of the PBGS monomer A viewed towards the active site. α -Helices are shown in blue, β -strands in orange. The active-site flap, covering the active-site pocket, is colored pink. Both Schiff-base-bonded 5F-LA molecules of the active site are shown and labeled P (P-site) and A (A-site). Figures 2, 3 and 5 were generated using MOLSCRIPT²⁹ rendered with Raster3D.³⁰

Table 1. Data collection and refinement statistics

A. Data collection	Data set I	Data set II
Space group	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2
Cell dimension (<i>a</i> , <i>c</i> (Å))	127.5, 86.1	127.1, 86.2
Total ^a /unique reflections	509802/56270	433947/82775
Resolution range ^b (Å)	50.0–1.9 (1.97–1.90)	20.0–1.66 (1.72–1.66)
Completeness ^b (%)	99.9 (100)	99.9 (100)
Redundancy ^b	9.1 (8.9)	5.2 (4.9)
<i>R</i> _{merge} ^{b,c} (%)	14.1 (60.3)	11.6 (39.4)
<i>I</i> / <i>σ</i> _{<i>I</i>} ^b	17.4 (3.7)	11.0 (4.1)
Solvent content (%)	61.0	60.5
Temperature factor (Å ²)	19.7	21.8
B. Refinement		
Resolution range ^d (Å)		91.3–1.66
Reflections (>1 σ)		78644
Non-H protein atoms/dimer		5079
Solvent molecules/dimer		670
Levulinic acid molecules/dimer		4
Ion sites per dimer: Na ⁺ ; K ⁺ ; Mg ²⁺ ; SO ₄ ²⁻		1 + 0.5; 2; 2; 2
Average <i>B</i> -factor (Å ²): protein molecule A; molecule B; solvent		20.7; 25.0; 38.5
<i>R</i> -factor (%); <i>R</i> _{free} (%) ^e		17.5; 19.8
Ramachandran plot: most favored regions; outliers		91.6; 0.2
r.m.s. deviation from ideality: bond lengths (Å); bond angles (deg.)		0.02; 1.9
r.m.s. deviation of main-chain atoms between monomers A and B (Å)		0.482
Estimate overall coordinate error (Å)		0.1

^a Larger than 1.0 σ .
^b Value for shell of highest resolution in parentheses.
^c $R_{\text{merge}} = 100(\sum_{h,i} |I_{h,i} - \bar{I}_h| / \sum_{h,i} I_{h,i})$, where the summation is over all observations $I_{h,i}$ contributing to the reflection intensities I_h .
^d F_c for range 91.3–20.0 Å.
^e In all, 5% of data were omitted from refinement.³¹

around its dimeric partner. PBGS monomers are classical TIM-barrels,¹⁵ harboring the active site at the C-terminal end of the β -barrel. A flexible loop, the “active-site flap”,^{2,9} covers the active site and separates it from the surrounding medium (Figure 2). The metal-binding site ZnB of Zn²⁺-dependent PBGS from yeast and *E. coli* is located in the active site. The Mg²⁺-binding site MgC of PBGS from *P. aeruginosa* and *E. coli* PBGS, by contrast, is about 10 Å from the active site and near the N-terminal arm of the neighboring subunit. PBGS from *P. aeruginosa*, *E. coli* and yeast have both been co-crystallized with the inhibitor levulinic acid (LA, Figure 1(b)).^{2,9,14} These structures revealed an unoccupied A-site with the inhibitor LA covalently bound to the P-site by a Schiff base between its 4-oxo-group and an active-site lysine residue (Lys260 in *P. aeruginosa*; Lys246 in *E. coli* and Lys263 in yeast). Recently, the structures of *E. coli* and yeast PBGS in complex with the irreversible inhibitor 4,7-dioxosebacic acid (DOSA, Figure 1(b)), a diacid-based mimic of a possible reaction intermediate, first revealed simultaneous A and P-site occupancy. The inhibitor is covalently bound to two active-site lysine residues.^{3,4} Although the inhibitor resembles one of two possible reaction intermediates, the investigation of the enzymatic mechanism requires additional experiments.

To approach the problem from another angle, we present the high-resolution crystal structure of the inactive *P. aeruginosa* PBGS mutant Asp139 \rightarrow Asn (D139N) in complex with the inhibitor 5-fluoro-

levulinic acid (5F-LA, Figure 1(b)). The structure uniquely reveals the binding of two individual ALA-analogs, to both the A and P-sites. Both molecules are covalently linked to the two active-site lysine residues through Schiff bases using their 4-oxo-groups. On the basis of the structure and complementary kinetic data, we postulate a catalytic reaction mechanism, which includes the function of an active-site monovalent cation.

Results

Structure determination and quality of the model

The complex between the PBGS mutant D139N and 5F-LA was solved by difference Fourier synthesis, using the wild-type (WT) PBGS from *P. aeruginosa* as a model.⁹ It was refined to a resolution of 1.66 Å with reasonable crystallographic and stereochemical parameters (Table 1). The final model of the PBGS D139N dimer contains four molecules of 5F-LA, one fully and one partially occupied Na⁺, two K⁺, two Mg²⁺ and two SO₄²⁻. Residues 1 to 6 and 336 to 337 in monomer A and 1 to 5, 221 to 228 and 336 to 337 in monomer B were not modeled due to insufficiently resolved electron density. In all, 99.8% of the residues lie in the allowed region of the Ramachandran plot. The r.m.s. deviation for main-chain atoms between WT and mutant structures is 0.188 Å for molecule A, and 0.942 Å for molecule B.

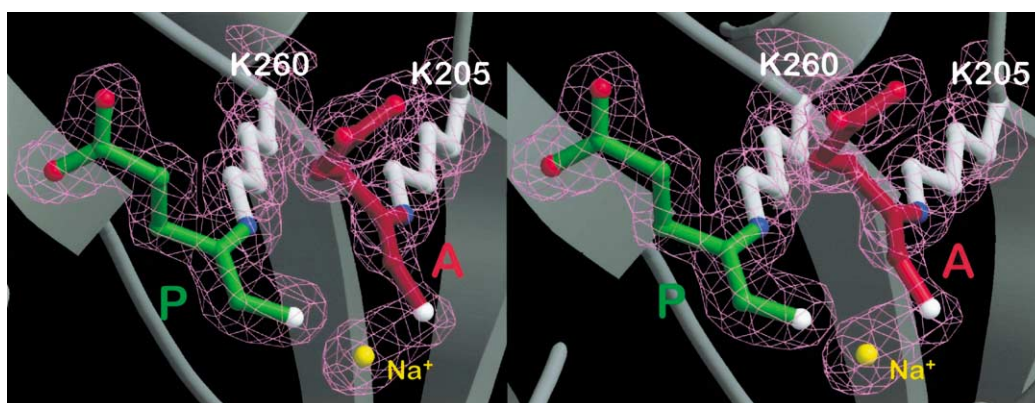


Figure 3. The final $2F_o - F_c$ -electron density (contoured at 1.5σ) of A-site and P-site 5F-LA in monomer A. They are covalently linked to Lys205 and Lys260, respectively, *via* Schiff bases.

Overall structure of 5F-LA to PBGS mutant D139N

The constituent dimer of PBGS from *P. aeruginosa* is asymmetric.⁹ Monomer A has a significantly lower overall atomic *B*-value and is structurally better defined than monomer B. The active site of monomer A adopts a closed conformation. It is shielded from the surrounding medium by the “active site flap”. In monomer B, by contrast, the active-site flap is partly disordered, yielding an open conformation. The asymmetry is also recognizable in the occupancy of MgC. It is fully occupied by an octahedrally coordinated Mg^{2+} in monomer A, but only partly occupied in B. The monomers thus reflect two states of the enzyme.

Binding of 5F-LA to PBGS monomer A

In the PBGS/5F-LA complex, the asymmetry of the *P. aeruginosa* PBGS dimer extends to the inhibitor binding-site. In monomer A, 5F-LA essentially binds to both the P and A-sites at full occupancy (Figure 3). The overall conformation of 5F-LA in the P-site is highly similar with that of P-site ALA found in the yeast PBGS/ALA complex.¹⁶ 5F-LA is covalently bound to Lys260 by a Schiff base through its 4-oxo group, as observed previously for LA and ALA.^{9,16} Its carboxylate group hydrogen bonds to amide nitrogen atom of Ser286 and to the side-chains of Tyr324 and Ser286. Otherwise, the P-site is largely hydrophobic with aromatic amino acid residues Phe86, Tyr214 and Tyr283 in close contact to the apolar parts of 5F-LA. These interactions stabilize the bound substrate by preventing the premature hydrolysis of the Schiff base. The 5-fluorine substituent mimics the 5-amino group of ALA and occupies the same position, revealed by a superposition of the complexes of *P. aeruginosa* PBGS/5F-LA and yeast PBGS/ALA (not shown).¹⁶ It is in contact (2.7 Å) with a well-defined spherical electron density, which we have modeled as a monovalent cation shared by the P and A-sites, though it is nearer to the latter (see below). The present structure is

unique, in that it reveals a well-defined single substrate-like molecule bound to the A-site for the first time. Mirroring the P-site, 5F-LA in the A-site is covalently bound to the enzyme by a Schiff base between its 4-oxo group and the side-chain of Lys205 (Figures 3 and 4). The inhibitor carboxylate moiety forms salt-bridges with the side-chains of Arg215 and Lys229 of the active-site flap and a hydrogen bond with the side-chain of Gln233. The fluorine atom is in close proximity (2.49 Å) to atom N^δ of Asn139. Atom O^δ of Asn139 also hydrogen bonds to atom N^ε of Lys229 of the active-site

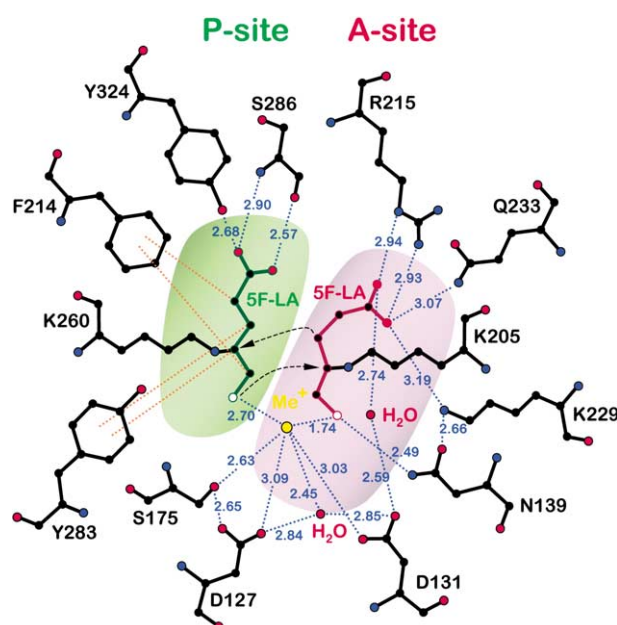


Figure 4. A representation of A-site and P-site 5F-LA in the active site of PBGS monomer A. The P-site and A-site substrate recognition pockets are underlaid in green and purple, respectively. Hydrogen bonding interactions are indicated by dotted blue lines and hydrophobic interactions by dotted orange lines. Protein bonds are in black, the P-site 5F-LA molecule in green, the A-site 5F-LA in red, fluorine atoms in white, and the monovalent cation in the A-site in yellow.

flap. The ordering and closure of the flap thus supports the substrate binding to the A-site.

The conformation of the two inhibitor molecules is dictated by the covalent Schiff base and the hydrogen-bonded carboxylate group. In both, the planarity imposed by the Schiff base extends to include the fluorine atoms. The resulting planar moieties of the two inhibitor molecules are roughly parallel with each other, as are the lysine side-chains, giving rise to two stacked T-shaped structures (Figure 3). In the P-site inhibitor, the planar region ends at position 3, whereas in the A-site inhibitor the planarity extends to position 2. This sp²-like planarity would predispose the A-side substrate for deprotonation (to form an intermediate enamine) as no further structural adjustment is required.

Binding of 5F-LA to PBGS monomer B

In monomer B, residues 220 to 231 of the active-site flap are disordered, leaving the active site partly open. P-site binding of 5F-LA is essentially identical with that by monomer A. In the A-site, by contrast, the inhibitor 5F-LA is resolved only partly, reflecting the absence of Lys229 (active-site flap) from the binding pocket. Only the carboxylate group of the inhibitor is well-resolved and interacts with the side-chains of Arg215 and Gln233 (as in monomer A). The remainder of the inhibitor is poorly defined and has been modeled as a combination of three conformations, one with 5F-LA covalently bound to Lys205 (as in monomer A) and two alternate conformations of free 5F-LA. In one of the latter, the fluorine atom of 5F-LA displaces the Na⁺, such that the overall occupancy for Na⁺ was modeled at 50%. Monomer B thus provides a snapshot of the A-site being filled prior to active-site closure and catalysis.

Communication between the active site and MgC

In the WT PBGS/LA complex, the side-chain of Asp139 adopts two alternate orientations.⁹ In monomer A (closed active site), it points towards the active site, whereas in monomer B (open) it forms a salt-bridge with Arg181. In the D139N/5F-LA complex, Asn139 retains these respective orientations in both monomers A and B. In monomer A, Asn139 hydrogen bonds to the fluorine atom of the inhibitor and Lys229 of the active-site flap, stabilizing the active site (Figure 4). In monomer B, Asn139 maintains a WT-like conformation despite the fact that the A-site is partly filled by 5F-LA and that Arg181 points towards a partially filled MgC, resembling monomer A. This suggests that in the present structure no direct communication is taking place between the active site and MgC, as postulated for the WT PBGS.⁹ Additional factors, such as more defined binding of the A-site 5F-LA and/or the active-site flap are thus required to induce Asn139 to adopt a

monomer A-type conformation and to fully close the active site.

A monovalent cation in the active site

Monovalent ions reportedly support both the catalytic rate and the state of oligomerization for PBGS from *B. japonicum*⁵ and *P. aeruginosa*.¹² In agreement with these findings, the present structure now reveals a monovalent cation in the active site of monomer A located between the two fluorine moieties of A and P-site 5F-LA. The temperature factor as well as the chemical nature of the protein ligands and solvent molecules suggest that it is Na⁺, though *in vivo* it may also be K⁺. The Na⁺ is coordinated by the side-chains of Asp127, Asp131 and Ser175, the fluorine moieties of both 5F-LA molecules in the P and A-site as well as a water molecule. This coordination sphere is part of a network of hydrophilic interactions extending throughout most of the active site (Figure 4).

As indicated above, Na⁺-binding in monomer B is less clear, due to the disorder of the inhibitor and the active-site flap. Its occupancy is modeled at 50%. The location and coordination of this site is analogous to monomer A. Nevertheless, some neighboring interactions are abrogated by the absence of Asn139 and Lys229 from the active site, underlining the overall greater flexibility of monomer B.

PBGS mutants

The crystal structures of WT *P. aeruginosa* and D139N PBGS indicate specific functions of individual amino acid residues in Na⁺-coordination, MgC/active site communication, and A and P-side ALA binding. To further elucidate these derived functions, the following single residue mutants were prepared: Asp131 → Glu (D131E, Na⁺-coordination), D139N (link between MgC and active site), K205S and Q233E (A-side ALA-binding) and K260A (P-side ALA binding, see above). All mutant enzymes lack detectable activity, supporting their crucial functional importance. The detailed structural changes inflicted by these mutations have not been characterized crystallographically.

PBGS inhibition

The 5F-LA inhibition was investigated by a dose-response plot and compared with LA. In the case of 5F-LA, an IC₅₀ value of 0.9 mM was obtained,

Table 2. Kinetic data for PBGS inhibitors

Inhibitor	IC ₅₀ -value (mM)
LA	10
5F-LA	0.9

and 10 mM for LA, both moderately strong inhibitors (Table 2). The additional fluoride atom thus induces a near 11-fold increase in inhibition. This effect is supported by the present crystal structure, which shows 5F-LA bound tightly to both A and P-sites, and the fluorine moiety of both 5F-LA molecules involved in important hydrophilic interactions (Figures 3 and 4). In view of the convincing match of the 5F-LA bound to the P-site with the structures of the other inhibitor–enzyme complexes and especially the substrate–enzyme complexes determined so far, we postulate, that the conformation of our inhibitor mimics adequately the conformation of the natural substrate bound to the P-site. The binding of the second inhibitor to the A-site, as observed in our X-ray structure should therefore be a reasonable mimic for the binding of the second molecule of ALA.

Discussion

Substrate binding to PBGS

PBGS is an unusual enzyme in being able to condense two identical substrate molecules asymmetrically. For this purpose, each substrate molecule is recognized by a distinct binding pocket (the A-site and the P-site) in the active site. The resulting defined orientation of the substrate molecules relative to each other is essential for efficient catalysis. Structurally elucidating these substrate-binding modes is thus a critical precondition for understanding the detailed reaction mechanism of PBGS. Chemical trapping studies identified one of the ALA substrates covalently bound to the P-site lysine.^{17–19} Accordingly, the inhibitor LA and the substrate ALA have been observed crystallographically to form a Schiff-base to this lysine residue.^{2,9,14,16} The P-site has therefore been well characterized. Remaining uncertainties pertain to the binding of the second ALA to the A-site. Current models of the reaction mechanism alternatively propose free A-side ALA coordinated to ZnB³ or an A-side ALA Schiff-base bonded to a second lysine residue in the A-site.^{1–4} In both cases, the P-side ALA is covalently bound to the enzyme.

Recent crystal structures first demonstrate that the inhibitors DOSA and 4-oxosebacic acid occupy both the P-site and the A-site. Both inhibitors bind in a similar conformation, even though the latter can form only one Schiff base, to the P-site lysine residue. The crystal structures are compatible with the proposed presence of two Schiff base bonds between the two ALA and the two lysine residues in the active site and indicate the residues responsible for carboxylic moiety recognition in the A-site.^{3,4} DOSA has been created to mimic one of two possible reaction intermediates in which the C–N bond formation has occurred first. However, the additional free amino group of the true reaction intermediate is lacking.

The complex between PBGS and 5F-LA, presented here, adds significant details to the understanding of the outset of the reaction. (i) It is the first structure to show that two identical substrate analogs may bind to the active site of a PBGS. (ii) By leaving no void or disordered side-chain in the active site, it provides the most detailed model of the native substrate-bound state and fully identifies all residues involved in A-site as well as P-site formation for non-Zn-dependent PBGS. (iii) The distinct conformations observed for the two inhibitor molecules renders a deprotonation of the P-side substrate difficult, whereas the A-side substrate is predisposed for the formation of the enamine in perfect accordance with the needs of the C–C bond formation. (iv) It reveals for the first time that an alkaline metal ion may be required in Mg²⁺-PBGS to stabilize ALA in a defined conformation in the polar A-site and moderate the activity of P-side ALA. (v) Due to the asymmetry of the PBGS dimer, monomer B provides a snapshot of the process of filling the A-site.

Moving from the partly assembled state represented by monomer B to the fully assembled active site seen in monomer A requires the following series of fast events. (i) The monovalent cation enters the catalytic center, where it is stabilized by Asp127, Asp131 and Ser175, a water molecule and the amino group of the P-side ALA. (ii) The A-side ALA, coordinated through its carboxylate group, adopts a conformation such that its amino group is near the cation, allowing the Schiff base link to Lys205. (iii) Asp139 flips into the active site, further stabilizing the amino moiety of A-side ALA, Arg181 flips towards the metal binding site MgC, allowing the coordination sphere of Mg(II), possibly signaling the closed active-site state to the second monomer. (iv) Concomitantly, Lys229 contributes to the active site by fully closing the active-site flap.⁹ In this state, represented by monomer A of the present structure, the active site is poised for catalysis to proceed.

Note, however, that the present structure differs from a native PBGS/substrate complex in two important details that has made the current observations possible. Asp139 was mutated to asparagine, and the ALA amino group was replaced by fluorine. The hydrogen bond observed between Asn139 and the fluorine atom of 5F-LA in the active site presumably substitutes for the native hydrogen bond between Asp139 and the A-site ALA amino group in the WT protein, providing us with a native-like initiation state.

Replacing the amino moiety of ALA by fluorine in 5F-LA may additionally have changed the preference of the monovalent metal ion. *In vivo*, K⁺, preferring less ionic interactions,²⁰ could instead complete the active site. Nevertheless, the previously proposed involvement of a monovalent metal ion in the stabilization of the active site and thereby in catalysis^{5,12} is first observed in our complex.

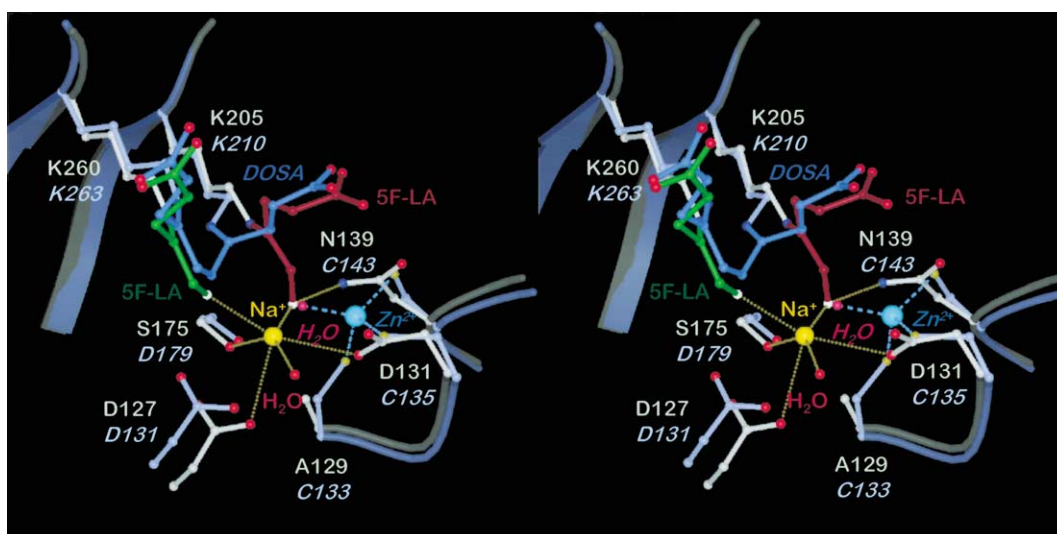


Figure 5. Overlay of the active sites of the complexes *P. aeruginosa* PBGS/5F-LA and yeast PBGS/DOSA. Strands, loops and residues are colored in shades of khaki for *P. aeruginosa* PBGS/5F-LA and in nuances of blue for yeast PBGS/DOSA. Labels for the latter are italic. Yellow dotted lines indicate the coordination sphere of Na⁺ (yellow) in *P. aeruginosa* PBGS/5F-LA, blue dashes those of Zn²⁺ (cyan) in yeast PBGS/DOSA. Fluorine and sulfur atoms are white and dark yellow, respectively.

Catalytic mechanism

The structure of PBGS-D139N/5F-LA provides the strongest support yet for a catalytic mechanism initiated by the consecutive binding of the two ALA molecules through Schiff bases to both the P and A-sites (steps I and II in Figure 6). Energetically, this contributes only marginally to the overall reaction. The exergonic steps, producing the aromatic PBG, would be expected to be fast, making it difficult to trap any reaction intermediates. The structure of PBGS complexed with DOSA did not resolve the long-standing question of whether the C–C bond (aldol condensation⁴) or C–N bond formation³ occurs first.

Regarding the overlay of the structures of the complexes of yeast PBGS with DOSA and *P. aeruginosa* PBGS with 5F-LA (Figure 5) it becomes obvious why neither of the inhibitors undergoes the aldole condensation. Though a mimic for a C–N bond intermediate, DOSA still forms both Schiff bases. This leads to a non-native conformation of the inhibitor of the corresponding A-site lysine C–N bond. As a result, the ring-closing C–C bond formation, already stereo-electronically disfavored, is abrogated. In the complexes of *P. aeruginosa* PBGS with 5F-LA the extended planarity of both inhibitor molecules around C4 suggests, that they are probably partly present in an enamine form due to the activation through the electrophilic fluorine moiety. This lack of necessary complementarity of the reactive centers hinders the C–C bond formation in this case.

Assuming the Schiff base formation between the two substrates to be the first step, the reaction would proceed from A-side Schiff base with

Lys205 to the inter-substrate Schiff base. This iso-energetic process would not bear any thermodynamic driving force. The complexation of the neutral P-side amino group with the monovalent cation is a reasonable means to weaken the nucleophilicity of the amine in order to postpone the formation of the inter-substrate Schiff base. This would effectively prevent the premature attack of position 4 of the A-side substrate by this lone pair.

As mentioned earlier the conformational arrangement of both 5F-LA molecules around their C3 atoms (Figures 3 and 5) suggests that the P-side-ALA is bound in the iminium form, while hybridization of the A-side-ALA-lysine Schiff base to the corresponding enamine form (step III, Figure 6) is facilitated. We consequently propose that the first step of the reaction is the aldol-like C–C bond formation (step IV, Figure 6). The formation of the C–C bond is electronically allowed and follows the Bürgi–Dunitz angle of attack. Due to the introduction of the new C–C bond and the accompanying changes in hybridization, the forming product probably has to undergo major conformational changes, weakening or completely abolishing the coordination of the monovalent cation by the two amino groups. The next step would then be the formation of the intersubstrate Schiff base (steps V–VII in Figure 6), followed by the *trans*-elimination of the C–N bond between the P-side substrate and lysine 260 (steps VIII + IX in Figure 6). It is only at this late stage that the bond between the substrate and the enzyme is broken. The last step is the deprotonation/aromatization step (step X in Figure 6), which should be extremely fast and which will be the thermodynamic driving force of the whole reaction sequence.

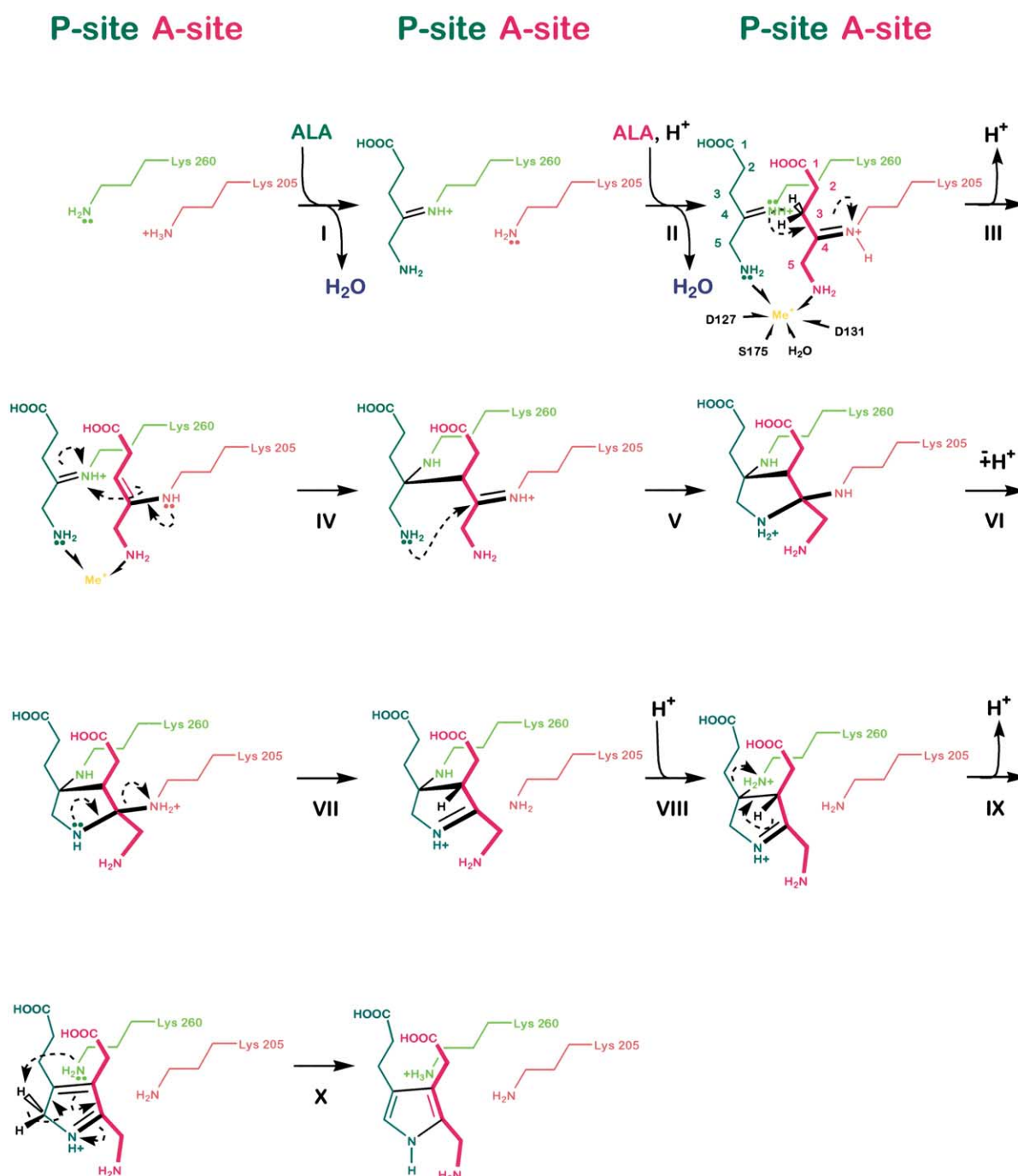


Figure 6. Proposed catalytic mechanism of PBGS from *P. aeruginosa*. P-site and A-site ALA are shown in green and red, respectively. The steps in the condensation of A and P-side ALA to form PBG are indicated by roman numerals. (I) Binding of P-side ALA. (II) Binding of A-side ALA. (III) Abstraction of H^+ from C3 of A-side ALA, yielding the A-site enamine. (IV) Aldole addition forming the C-C bond between A- and P-side-ALA. (V-VII) Schiff-base exchange producing a C-N bond between A-side and P-side ALA. (VIII) Transfer of H^+ to Lys260. (IX) Trans-elimination of P-site lysine. (X) Abstraction of the *pro-R*- H^+ from C5 of P-side ALA, aromatization and release of PBG.

The increase in the hydrophobicity of the active site, the loss of a metal-chelating group and the corresponding perturbation of the network of hydrogen bonds and salt-bridges that characterize the original Michaelis-Menten complex will cooperate to release the active-site flap, allowing the release of PBG.

Interestingly, the Na^+ -site in the present PBGS complex occupies a different position compared to the $MeB-Zn^{2+}$ of Zn^{2+} -binding PBGS (Figure 5). While ZnB is at the edge of the A-site, Na^+ is located such that it is coordinated by both substrate molecules. A superposition of the active site of the present structure and that of the complex

between yeast PBGS and DOSA (Figure 5) indicates that the fluorine atom of 5F-LA (a mimic of the ALA amino group) is located midway between the two metal sites. In the latter complexes, this position is occupied by a water molecule coordinated by ZnB. The position of ZnB is taken by Asn139 in the crystal structure containing 5F-LA.

This suggests, that both metal ions, though chemically different and located in distinct positions, may share the same function in stabilizing A-side ALA through its amino moiety. As the Zn ion does not interact with the P-site substrate, the metal ions may differ in their contribution to catalysis throughout the reaction sequence.

Materials and Methods

Protein production and kinetics

Single amino acid mutations were introduced, using the QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, USA). Production and purification of *P. aeruginosa* PBGS mutants were performed as described.⁹

Primer sequences

D131E:
Sense: 5'-C GAC GTG GCG CTC CAG CCG TTC ACC ACC-3'
Antisense: 5'-GGT GGT GAA CCG CTG GAG CGC CAC GTC G-3'
D139N:
Sense: 5'-CC CAT GGC CAG AAC GGC ATC CTG G-3'
Antisense: 5'-C CAG GAT GCC GTT CTG GCC ATG GG-3'
K205S:
Sense: 5'-G GCC TAC TCG GCC TCG TAC GCC AGC GCC-3'
Antisense: 5'-GGC GCT GGC GTA CGA GGC CGA GTA GGC C-3'
Q233E:
Sense: 5'-GC AAC AAG GCC ACC TAC GAG ATG GAT CCG G-3'
Antisense: 5'-C CGG ATC CAT CTC GTA GGT GGC CTT GTT GC-3'
K260A:
Sense: 5'-G GTG ATG GTC GCG CCG GGC ATG CCC-3'
Antisense: 5'-GGG CAT GCC CGG CGC GAC CAT CAC C-3'

Kinetic investigations

Inhibition

The assay conditions were 100 mM bis-tris-propane (pH 8.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.4 mM ALA, between 100 mM and 0.1 μM 5F-LA and 8 μg/ml of PBGS. PBGS and 5F-LA were preincubated for 45 minutes at 37 °C prior to addition of the ALA solution,

preheated to 37 °C. Reaction was allowed to proceed for 30 minutes and stopped by addition of one equivalent of 20% (v/v) trichloroacetic acid: 600 μl of this solution was mixed with 600 μl of modified Ehrlich's reagent and incubated for ten minutes. Porphobilinogen formation was determined by measuring absorption at 555 nm ($\epsilon_{555} = 62,000 \text{ M}^{-1}$). The experimental data were fit against the following equation: $v_i/v_0 = 1/(1 + ([I]/IC_{50}))$, where [I] is the inhibitor concentration (in μM) and IC₅₀ is the inhibitor concentration giving 50% inhibition.²¹

Relative activity of PBGS mutants

Linear increase of porphobilinogen was measured. Assay conditions were 100 mM bis-tris-propane (pH 8.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM ALA and 30 μg/ml of PBGS. The reaction is started by mixing preheated (37 °C) ALA solution with preheated protein solution and incubated for up to 30 minutes for WT-PBGS, or 90 minutes for PBGS-mutants. After each three minutes, 500 μl of the reaction mixture was removed and quenched with 500 μl of stop reagent (20% trichloroacetic acid). Then 600 μl of this solution was mixed with 600 μl of modified Ehrlich's reagent and incubated for ten minutes. Porphobilinogen formation was determined by measuring absorption at 555 nm ($\epsilon_{555} = 62,000 \text{ M}^{-1}$).

Crystallization and structure determination

Purified PBGS mutant D139N was dialyzed against 50 mM K-Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ and concentrated to 12 mg/ml. A portion (990 μl) of protein solution was mixed with 10 μl of 2 mM 5F-LA (in the same buffer) and kept at room temperature for one hour. A sparse matrix crystallization screen was performed using Wizard Screen I (Emerald BioStructures, Bainbridge Island, USA) in 96-well CrystalClear strip racks (Hampton Research, Laguna Niguel, USA), 100 μl reservoir solutions, drops consisting of 3 μl of reservoir solution plus 3 μl of protein solution. Square-shaped crystals (300 μm × 300 μm × 50 μm) isomorphous to the crystals of WT PBGS⁹ were obtained after four to seven months from 1 M Na/K tartrate, 0.2 M Li₂SO₄, 0.1 M Ches (pH 9.5). Prior to X-ray data collection crystals were washed in a cryoprotective solution (70% (v/v) reservoir solution, 30% (v/v) glycerol) and flash-frozen in liquid N₂. Data collection was performed under cryogenic conditions using Cu K_α radiation and a Rigaku-MSR R-Axis IV⁺⁺ image plate (data set I) and synchrotron radiation (DESY Hamburg, beamline BW6, $\lambda = 1.05 \text{ Å}$) using a MAR Research CCD detector (data set II) (Table 1).

The structure of PBGS mutant D139N in complex with 5F-LA was solved by difference Fourier synthesis, using the refined model of WT PBGS from *P. aeruginosa* (PDB code 1b4k) and data set I. This was followed by several rounds of refinement using CNS²² and manual model building using O.²³ Refinement was completed using dataset II and several cycles of REFMAC²⁴ and ARP/WARP.²⁵ Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and SO₄²⁻ ions were incorporated to match the electron density, temperature factors and coordination sphere. In obvious cases, two to three alternate amino acid conformations were modeled. The quality of the structure was checked using PROCHECK²⁶ and WhatIf.²⁷

The overlay of the complex 5F-LA/*P. aeruginosa* PBGS and the complex DOSA/yeast PBGS was generated with the program LSQKAB, searching for the best fit for the eight central β -strands of both proteins.

While this work was being revised, the complex between *E. coli* PBGS and 4-oxosebacic acid was published.²⁸

Protein Data Bank accession code

Structural coordinates may be retrieved from the RCSB Protein Data Bank under the code 1gzg.

Acknowledgments

We thank H. Fritzsche (University of Freiburg, Germany) and Dr R. Frank (GBF Germany) for helpful discussions. Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn (DFG) to D.W.H. and to D.J. is gratefully acknowledged.

References

1. Neier, R. (1996). Chemical synthesis of porphobilinogen and studies of its biosynthesis. *Advan. Nitrogen Heterocycles*, **2**, 135–146.
2. Erskine, P. T., Norton, E., Cooper, J. B., Lambert, R., Coker, A., Lewis, G. *et al.* (1999). X-ray structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* complexed with the inhibitor levulinic acid at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **38**, 4266–4276.
3. Kervinen, J., Jaffe, E. K., Stauffer, F., Neier, R., Wlodawer, A. & Zdanov, A. (2001). Mechanistic basis for suicide inactivation of porphobilinogen synthase by 4,7-dioxo sebacic acid, an inhibitor that shows dramatic species selectivity. *Biochemistry*, **40**, 8227–8236.
4. Erskine, P. T., Coates, L., Newbold, R., Brindley, A. A., Stauffer, F., Wood, S. P. *et al.* (2001). The X-ray structure of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase complexed with two diacid inhibitors. *FEBS Letters*, **503**, 196–200.
5. Petrovich, R. M., Litwin, S. & Jaffe, E. K. (1996). *Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase uses two Mg(II) and monovalent cations. *J. Biol. Chem.* **271**, 8692–8699.
6. Senior, N. M., Brocklehurst, K., Cooper, J. B., Wood, S. P., Erskine, P., Shoolingin-Jordan, P. M. *et al.* (1996). Comparative studies on the 5-aminolaevulinic acid dehydratases from *Pisum sativum*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **320**, 401–412.
7. Frankenberg, N., Hungerer, C., Kittel, T. & Jahn, D. (1998). Cloning and characterisation of the *Pseudomonas aeruginosa* hemB encoding a magnesium-dependent aminolevulinic acid dehydratase. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 485–489.
8. Frankenberg, N., Heinz, D. W. & Jahn, D. (1999). Production, purification, and characterization of a Mg²⁺-responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **38**, 13968–13975.
9. Frankenberg, N., Erskine, P. R., Cooper, J., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. (1999). High-resolution crystal structure of a magnesium-dependent 5-aminolevulinic acid dehydratase. *J. Mol. Biol.* **289**, 591–602.
10. Jaffe, E. K. (2000). The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Crystallog. sect. D*, **56**, 115–128.
11. Nandi, D. L. & Shemin, D. (1968). Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides* II. Association to polymers and dissociation to subunits. *J. Biol. Chem.* **243**, 1231–1235.
12. Frankenberg, N., Jahn, D. & Jaffe, E. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* contains a novel type V porphobilinogen synthase with no required catalytic metal ions. *Biochemistry*, **38**, 13976–13982.
13. Erskine, P. T., Senior, N., Awan, S., Lambert, R., Lewis, G., Tickle, I. J. *et al.* (1997). X-ray structure of 5-aminolaevulinic acid dehydratase, a hybrid aldolase. *Nature Struct. Biol.* **4**, 1025–1031.
14. Erskine, P. T., Newbold, R., Roper, J., Coker, A., Warren, M. J., Shoolingin-Jordan, P. M. *et al.* (1999). The Schiff base complex of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase with laevulinic acid. *Protein Sci.* **8**, 1250–1256.
15. Reardon, D. & Faber, G. K. (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* **9**, 497–503.
16. Erskine, P. T., Newbold, R., Brindley, A. A., Wood, S. P., Shoolingin-Jordan, P. M., Warren, M. J. & Cooper, J. B. (2001). The X-ray structure of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase complexed with substrate and three inhibitors. *J. Mol. Biol.* **312**, 133–141.
17. Gibbs, P. N. & Jordan, P. N. (1986). Identification of lysine at the active site of human 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* **236**, 447–451.
18. Jaffe, E. K. & Hanes, D. (1986). Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalyzed reaction. Requirements for Schiff's base formation. *J. Biol. Chem.* **261**, 9348–9353.
19. Spencer, P. & Jordan, P. M. (1995). Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **305**, 151–158.
20. Woehl, E. U. & Dunn, M. F. (1995). The roles of Na⁺ and K⁺ in pyridoxal phosphate enzyme catalysis. *Coord. Chem. Rev.* **144**, 147–197.
21. Copeland, R. A. (1996). Dose-response curves of enzyme inhibition. In *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (Copeland, R. A., ed.), pp. 204–209, Wiley-VCH, New York.
22. Brünger, A. T. (1998). A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905–921.
23. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110–119.
24. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. H. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallog. sect. D*, **53**, 240–255.
25. Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.* **6**, 458–463.
26. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to

- check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283–291.
27. Hooft, R. W. W., Sander, C., Vriend, G. & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature*, **381**, 272.
28. Jaffe, E. K., Kervinen, J., Martins, J., Stauffer, F., Neier, R., Wlodawer, A. & Zdanov, A. (2002). Species-specific inhibition of porphobilinogen synthase by 4-oxosebacic acid. *J. Biol. Chem.* **277**, 19792–19799.
29. Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **24**, 946–950.
30. Merrit, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 869–873.
31. Brünger, A. T. (1992). Free *R*-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472–475.

Edited by R. Huber

(Received 20 February 2002; received in revised form 7 May 2002; accepted 8 May 2002)

Anhang 2

Glutamat auf Abwegen: Die tRNA-abhängige Tetrapyrrol-Biosynthese

(Frere, F. *et al.*, 2003, *Biospektrum*, **2/2003**, 133-7)

Glutamat auf Abwegen:

Die tRNA-abhängige Tetrapyrrol-Biosynthese

Jürgen Moser¹, Frederic Frère¹, Dirk W. Heinz², Dieter Jahn¹ & Wolf-Dieter Schubert²

¹Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig; ²Abteilung Strukturbiologie,

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig.

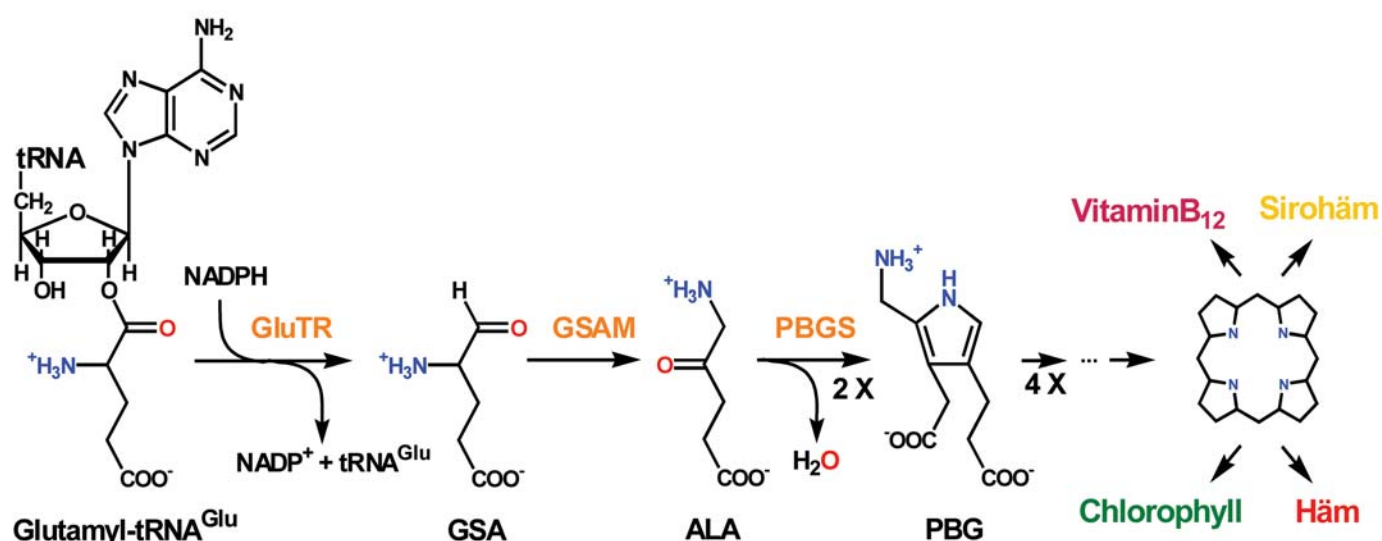


Abb. 1: Die initialen Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese.

Tetrapyrrole, wie Chlorophyll und Häm, sind unverzichtbare Bestandteile vieler Enzyme und insbesondere der zentralen Komplexe der zellulären Energiegewinnung. Alle Tetrapyrrole werden aus 5-Aminolävulinsäure gebildet. Seit einigen Jahren weiß man, dass Pflanzen, Archaeen und fast alle Bakterien zur Synthese dieses ubiquitären Vorläufermoleküls Glutamyl-tRNA aus der Proteinbiosynthese abzweigen. Anschließend wird aus der 5-Aminolävulinsäure das Pyrrol Porphobilinogen gebildet. Die Aufklärung der Kristallstrukturen der drei beteiligten Enzyme in Kombination mit Funktionsanalysen führt zu einem atomaren Verständnis der Katalysemechanismen und bietet die Grundlage für die rationale Entwicklung neuer Antibiotika und Herbizide.

► Tetrapyrrole wie Chlorophyll und Häm sind für das Leben, wie wir es kennen, unverzichtbar. Sie sind für Reaktionen des Energiehaushalts wie die Photosynthese und die Respiration unerlässlich und fungieren zudem als prosthetische Gruppen verschiedener Enzyme. Tetrapyrrole kommen vor und werden in acht Klassen eingeteilt: (Bakterio-)Chlorophylle, Häme (mit Porphyringrundgerüst), Sirohäme, Häm d1 (mit Porphonoidgrundgerüst), Corrinoide (z. B. Vitamin B₁₂), Coenzym F₄₃₀ und offenkettige Tetrapyrrole (Biline). Sie unterscheiden sich bezüglich des Sättigungsgrads des Ringsystems, der Struktur der Seitenketten und der zentral komplexierten Metallionen. Eukaryonten bilden Häme, Sirohäm und Chlorophyll. Prokaryonten synthetisieren außerdem Bakteriochlorophyll, Corrinoide und das Coenzym F₄₃₀.

Zwei Wege zur 5-Aminolävulinsäure

Alle Tetrapyrrole werden aus 5-Aminolävulinsäure (ALA) gebildet (Abb. 1). Der Mensch, Tiere, Pilze und die Gruppe der

α-Proteobakterien bilden ALA durch die enzymatische Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin. In Pflanzen, Archaeen und fast allen Bakterien wird ALA in zwei Reaktionsschritten synthetisiert. Als Substrat dient Glutamyl-tRNA, ein Makromolekül, das wir eigentlich aus der Proteinbiosynthese kennen. Bei der Tetrapyrrolbiosynthese wird Glutamat von der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA) reduziert. Dieser Aldehyd wird dann von der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM) zu ALA umgewandelt. Zwei dieser ALA-Moleküle werden anschließend durch die Porphobilinogensynthase (PBGS) in einer ungewöhnlichen Kondensationsreaktion asymmetrisch zum Pyrrolderivat Porphobilinogen (PBG) umgesetzt.

Biochemische Analysen in Kombination mit hochaufgelösten Röntgenstrukturen erlaubten es, den Reaktionsmechanismus aller drei Enzyme mit atomarer Genauigkeit zu beschreiben. Ausgehend von der dreidimensionalen Struktur der GluTR und der GSAM wurde postuliert, dass beide Enzyme zu einem funktionellen Komplex asso-

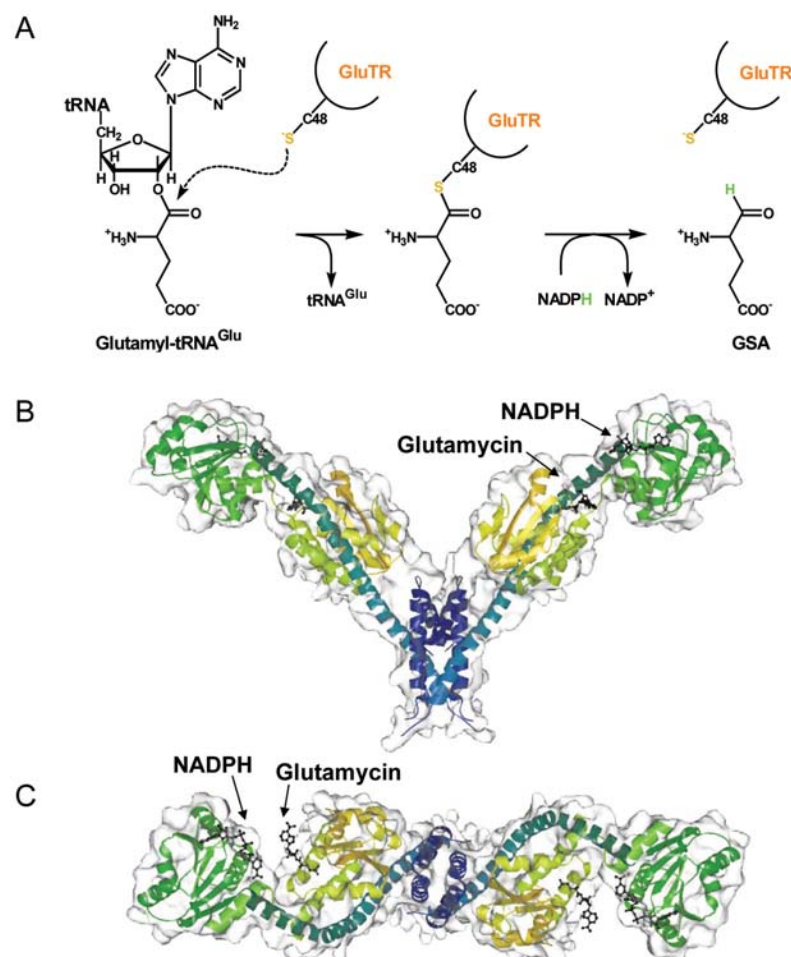


Abb. 2: Der Reaktionsmechanismus (A) und die Struktur der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) von vorn (B) und von oben (C). Das dimere Protein, in seiner molekularen Oberfläche dargestellt, besteht aus einer N-terminalen katalytischen Domäne (Gelb), einer NADPH-bindenden Domäne (Grün) und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (Blau). Strukturell werden die Domänen durch eine Rückgrat-ähnliche α -Helix (Türkis) verknüpft. Der gebundene Inhibitor Glutamycin (Schwarz) identifiziert das katalytische Zentrum des Enzyms, während das NADPH (Schwarz) anhand homologer Proteine in die entsprechende Bindungstasche modelliert werden konnte.

ziieren. Das darauf aufbauende Modell der Produktweiterleitung liefert eine Erklärung, wie das hochreaktive GSA, vor Solvens geschützt, zwischen den Enzymen effizient übertragen werden kann.

Die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR)

Die Herstellung und Reinigung rekombinanter GluTR aus dem extrem thermophilen Archaeon *Methanopyrus kandleri* erlaubte erstmals die Formulierung des Enzymmechanismus^[1]. Ein Cystein im aktiven Zentrum greift nukleophil die Aminoacylbindung des Substrates an, wodurch ein Thioester-Zwischenprodukt entsteht und die tRNA freigesetzt wird^[2]. Der Thioester wird anschließend über einen direkten Hydrid-Transfer von NADPH reduziert, so dass GSA entsteht. Die Kristallstruktur der GluTR im Komplex mit dem kompetitiven

Inhibitor Glutamycin bestätigte den vorgeschlagenen Mechanismus^[3] (Abb. 2a). Der gebundene Inhibitor Glutamycin ähnelt strukturell dem 3'-terminalen Ende des tRNA-Substrats und erklärt somit die chemischen Grundlagen der Substraterkennung und Katalyse. Überraschender als der Mechanismus war jedoch die Gesamtstruktur des Enzyms. Die homodimere GluTR besteht aus drei Domänen, die über eine sehr lange gebogene α -Helix miteinander verknüpft sind (Abb. 2b, c). Die N-terminale Domäne beherbergt das aktive Zentrum, identifiziert über die Bindung des Inhibitors. Es folgt eine typische Nukleotidbindungsdomäne (Rossmann-fold). Die dritte Domäne ist für die Dimerisierung zweier Monomere verantwortlich, was zur Bildung der ungewöhnlichen V-förmigen Struktur des Enzyms führt.

Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM)

GSA kann durch den Austausch der Amino- und Aldehydfunktionen in ALA überführt werden. Diese Reaktion wird durch GSAM katalysiert. Im Gegensatz zur klassischen Aminotransferase-Reaktion kommt es hier zu einem intramolekularen Austausch der Oxo- und Aminofunktionen. Bezüglich Struktur und Mechanismus handelt es sich bei der GSAM jedoch um eine klassische Aminotransferase mit einer Aspartat-Aminotransferase-ähnlichen Faltung. In der dimeren Struktur der GSAM umschlingen sich die beiden Monomere symmetrisch^[4] (Abb. 3b). Jedes Monomer besitzt drei durch zentrale β -Faltblätter definierte Domänen. Kofaktor und Substrat werden an der Kontaktfläche zwischen den Monomeren über zwei symmetrisch angeordnete Kofaktor- und Substratbindungsstellen gebunden. Die Dimer-Symmetrie ist jedoch nicht perfekt, da eine funktional essentielle Schleife über der Substratbindungsstelle in einem Monomer teilweise flexibel, im zweiten Monomer jedoch fest geschlossen vorliegt^[5] (Abb. 3b). Vermutlich oszilliert GSAM zwischen zwei Konformationszuständen, wobei jeweils ein Monomer eine geschlossene, katalytisch aktive Konformation einnimmt und das zweite Monomer sich in einem katalytisch inkompetenten Zustand mit geöffnetem Zugang befindet.

Produktübertragung von der GluTR zur GSAM

Für die tRNA-abhängige Biosynthese der ALA in Pflanzen und fast allen Bakterien wird der Metabolit GSA durch die GSAM weiter umgesetzt. GSA, das Produkt der GluTR-Reaktion, ist eine sehr reaktive Verbindung, die unbeschadet von der GluTR zur GSAM übertragen werden muss. Die offene V-förmige Struktur der GluTR legt nahe, dass ein direkter und enger Kontakt zwischen beiden Enzymen stattfinden kann. Die *in silico* simulierte Annäherung von GluTR und GSAM entlang ihrer gemeinsamen Dimerachse ergab eine erstaunlich gute Oberflächenkomplementarität beider Enzyme^[3] (Abb. 4), wobei sich die aktiven Zentren der GluTR und GSAM räumlich nahe kommen. Das aktive Zentrum der GluTR hat offensichtlich einen „Hinterausgang“^[6], der im Komplex genau über der Öffnung des aktiven Zentrums der GSAM (s. oben) zu liegen kommt. Damit wäre eine direkte Übertragung des Produkts der GluTR an die GSAM möglich, ohne dass GSA mit dem wässrigen Milieu in Kontakt käme. Ein essentielles und konserviertes Histidin in der GluTR verschließt den Tunnel und scheint

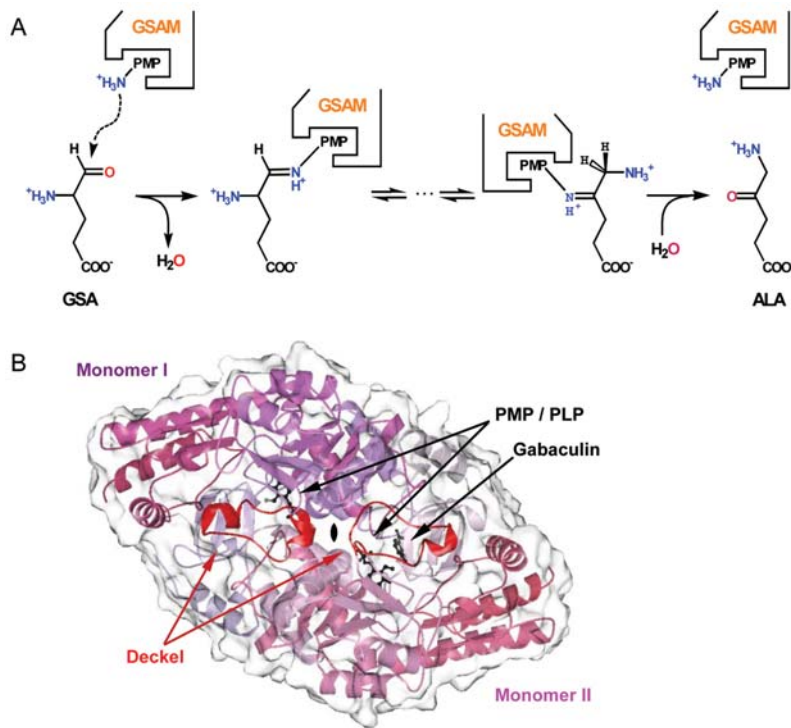


Abb. 3: Der Reaktionsmechanismus (A) und die Struktur (B) der Glutamat-semialdehyd-Aminomutase (GSAM). GSAM besteht aus zwei leicht asymmetrischen Monomeren (unterschiedliche Tönung des Farbverlaufs). Der Zugang zu den aktiven Zentren, hier lokalisiert durch die Kofaktoren PMP bzw. PLP und den Inhibitor Gabaculin (alle Schwarz), wird durch zwei Schlingen (Rot) reguliert.

kann (Abb. 5b). Das PBGS-Monomer weist als zentrales Faltungsmuster eine achtsträngige ($\beta\alpha$)₈-Fassstruktur auf. Am N-Terminus bilden etwa 30 Aminosäuren einen langen „Arm“, der aus dem zentralen Fass herausragt und sich um ein benachbartes Monomer im Oktamer legt. Das aktive Zentrum wird durch eine Schleife des Proteins verschlossen (Abb. 5c). Analog der GSAM liegen die Monomere eines Dimers in zwei verschiedenen Konformationen vor, bei denen eine lange Schleife und eine kurze α -Helix („Deckel“) mit katalytisch essentiellen Aminosäureresten entweder geordnet (geschlossene Konformation) oder ungeordnet (offene Konformation) vorliegen. Die Erkennung, Bindung und Aktivierung der beiden Substratmoleküle erfolgt durch die kovalente Schiff-Basenverknüpfung zu zwei Lysinen, wie durch Bindungsstudien und Strukturanalysen belegt werden konnte^[10]. Beide Lysine zeigen in gestreckter Konformation nahezu parallel in das aktive Zentrum. Basierend auf einem initialen Komplex mit zwei Inhibitormolekülen konnte ein Katalysemechanismus formuliert werden, bei dem als erster Reaktionsschritt die Aldolkondensation erfolgt^[10] (Abb. 5a). Die Kristallstruktur des Enzyms im Komplex mit einem Reaktions-Intermediat bestätigte den

die Funktion eines „Torwächters“ zu übernehmen, der nur GSA den Zutritt zur GSAM gestattet^[11].

Porphobilinogen-Synthase (PBGS)

Der erste gemeinsame Reaktionsschritt bei der Synthese aller Tetrapyrrole, die asymmetrische Kondensation von zwei Molekülen ALA zum Monopyrrol PBG, wird durch die PBGS katalysiert (Abb. 5a). Die Aminosäuresequenz der PBGS ist stark konserviert. Dennoch unterscheiden sich die Enzyme dieser Familie bezüglich ihrer Metallabhängigkeit^[7]. Die PBGS des Menschen und der Tiere sind Zn²⁺-abhängig und wird durch Pb²⁺ inhibiert, die Hauptursache von Bleivergiftungen. Die PBGS aus Bakterien und Pflanzen sind hingegen zumeist Mg²⁺-abhängig. Um den enzymatischen Mechanismus der PBGS-Katalyse auf molekularer Ebene zu verstehen, haben wir die Struktur der PBGS aus *Pseudomonas aeruginosa* aufgeklärt und das Enzym kinetisch charakterisiert^[8, 9]. Die PBGS ist ein Oktamer, das als Tetramer von Dimeren beschrieben werden

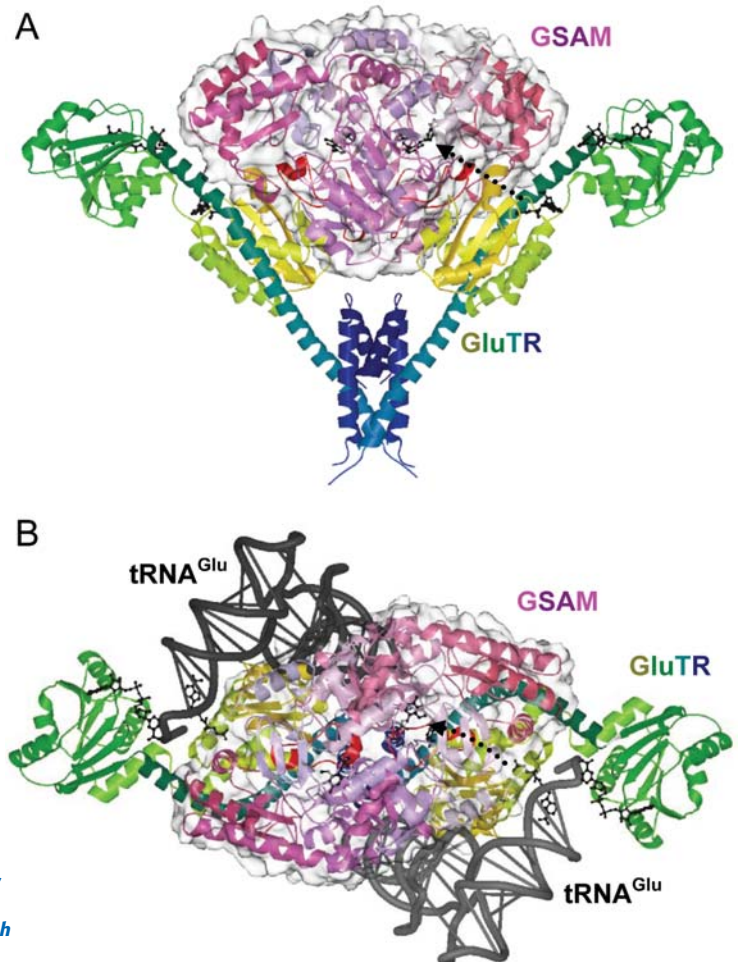


Abb. 4: Der postulierte Komplex aus GluTR und GSAM von vorne (A). Der vermutete Substratübertragungsweg ist als gestrichelter Pfeil eingezeichnet. In der Sicht von oben (B) sind zusätzlich noch zwei seitlich gebundene Glutamyl-tRNA-Moleküle (Grau) gezeigt.

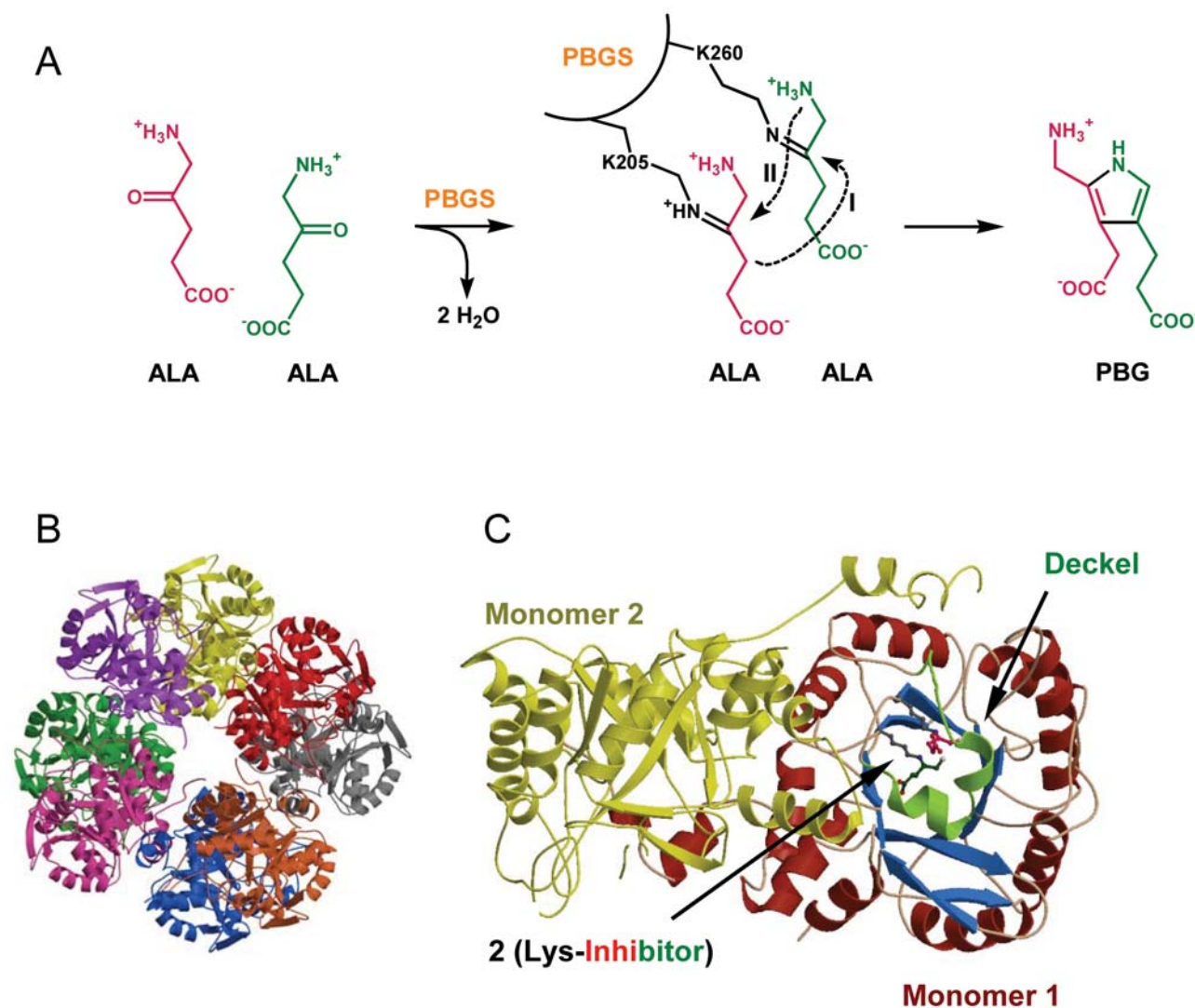


Abb. 5: Der Reaktionsmechanismus (A) und die Struktur der Porphobilinogensynthase (PBGS) als physiologisches Oktamer (B, acht farblich differenzierte Monomere) und als funktionelles Dimer (C, Gelbes und farbiges Monomer). Zwei Lysine (Grau) im aktiven Zentrum binden jeweils ein 5-Aminolävulinsäure-Molekül (hier ein roter und grüner Inhibitor) über Schiffbasenverknüpfung. Ein Deckel (Grün) verschließt während der Katalyse das aktive Zentrum.

vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus der PBGS. Demnach verursacht die abschließende Aromatisierung des Produktes im aktiven Zentrum eine Konformationsänderung, die zur Öffnung des Deckels und Freisetzung des Produkts führt.

Derzeit untersuchen wir den Einfluss verschiedener Metallionen (Zn²⁺, Mg²⁺ und K⁺) auf Struktur und Katalyse, und konnten bereits erste Enzymklassen-spezifische Inhibitoren identifizieren.

Von den Grundlagen zur Anwendung

Die kombinierte Struktur- und Funktionsanalyse der GluTR, GSAM und PBGS führt zu einem grundlegend erweiterten Verständnis des Biosyntheseweges der essentiellen Tetrapyrrol-Moleküle. Die Enzyme sind als Bestandteile eines essentiellen Syn-

thesewegs, der deutliche Unterschiede zwischen menschlichen, pflanzlichen und bakteriellen Systemen aufweist, prädestiniert für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren. Ein artspezifischer Eingriff in diesen zentralen Biosyntheseweg ist somit möglich und bietet sich als Ansatzpunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen (Antibiotika, Herbizide) an. Das detaillierte Verständnis dieser Enzyme wird zudem genutzt, um industriell bedeutende Prozesse wie die Vitamin B₁₂-Synthese zu optimieren.

Literatur

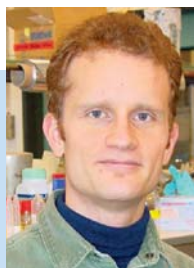
[1] Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. and Jahn, D. (1999): Methanopyrus kandleri glutamyl-tRNA-reductase. *J. Biol. Chem.* 274: 30679–30685

[2] Schauer, S., Chaturvedi, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W.-D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thomann, H.U., Heinz, D.W., Inokuchi, H., Söll, D. and Jahn, D. (2002): Escherichia coli glutamyl-tRNA reductase. Trapping the thioester intermediate. *J. Biol. Chem.* 277: 48657–48663

[3] Moser, J., Schubert, W.-D., Beier, V., Jahn, D. and Heinz, D.W. (2001): V-shaped structure of glutamyl-tRNA-reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J* 20: 6583–6590

[4] Hennig, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R.A. and Jansonius, J.N. (1997): Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: An α 2-dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4866–4871

[5] Contestabile, R., Angelaccio, S., Maytum, R., Bossa, F. and John, R.A. (2000): The contribution of a conformationally mobile, active site loop to the reaction catalyzed by glutamate semialdehyde aminomutase. *J. Biol. Chem.* 275: 3879–3886



Frederic Frère

Geboren 1973.
1994–1999 Studium der Chemie an der Universität Freiburg i. Br.

1999–2000 Diplomarbeit im Fach Biochemie in der AG Prof. Jahn zur Substraterkennung der Porphobilinogen-Synthase aus *Pseudomonas aeruginosa*. 2000–2003 Promotion an der TU Braunschweig in der AG Prof. Jahn zu Metallabhängigkeit und Reaktionsmechanismus der Porphobilinogen-Synthase aus *P. aeruginosa*.



Dirk Heinz

Jahrgang 1960, studierte 1980–1986 Chemie an der Universität Freiburg. 1986–1990 Dissertation über die Struktur von Serinproteaseinhibitoren bei Prof.

Dr. Markus Grütter (CIBA-GEIGY AG und Biozentrum Basel). 1990–1993 Postdoc an der University of Oregon, Eugene, USA. 1993–1998 Wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Dr. Georg E. Schulz (Universität Freiburg). 1998 Habilitation im Fach Biochemie. 1998–2002 Leiter einer Nachwuchsforschungsgruppe an der GBF in Braunschweig. Seit Mai 2002 Leiter der Abteilung Strukturbiologie an der GBF.



Jürgen Moser

Geboren 1971,
1991–1996 Studium der Chemie an der Universität Freiburg i. Br.

1996–1997 Diplomarbeit im Fach Biochemie. 1997–2000 Dissertation über den Katalysemechanismus der Glutamyl-tRNA-Reduktase. Seit 2000 Akademischer Rat in der Arbeitsgruppe von Prof. Dieter Jahn. Struktur- und Funktionsuntersuchungen an Enzymen der Tetrapyrrolbiosynthese in Bakterien.



Wolf-Dieter Schubert

Jahrgang 1966, studierte 1986–1991 an der University of Cape

Town, Südafrika, Chemie. 1992–1997 Dissertation über „Die Struktur des cyanobakteriellen Photosystem I“ bei Prof. Dr. Wolfram Saenger (Kristallographie, Freie Universität Berlin). 1998 Postdoc am National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBHT), MITI, Tsukuba, Japan. Seit 1998 Postdoc an der GBF.



Dieter Jahn

Jahrgang 1959, studierte 1978–1984 Biologie an der Universität Marburg. 1987 Dissertation im Fach Genetik über die Funktion von Transkriptionsregulatoren aus Krebszellen. 1988–1992 Postdoc an der Yale University, New

Haven, Connecticut, USA, Untersuchungen zur Chlorophyll-Synthese in Pflanzen und Grünalgen. 1994 Habilitation für das Fach Mikrobiologie an der Universität Marburg, Arbeiten zur Genregulation in Bakterien. 1996–2000 Professor für Biochemie in der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Freiburg. Enzymologie und Genregulation der Hämbildung in Bakterien. Seit 2000 Professor für Mikrobiologie an der TU Braunschweig.

Korrespondenzadresse:

Dr. Wolf-Dieter Schubert
Abteilung Strukturbiologie
GBF
Mascheroder Weg 1
D-38104 Braunschweig
Tel.: 0531-6181-988
Fax.: 0531-6181-763
wds@gbf.de

[6] Schubert, W.-D., Moser, J., Schauer, S., Heinz, D.W. and Jahn, D. (2002): Structure and function of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and prokaryotes. *Photosynth. Res.* 74: 205–215

[7] Jaffe, E.K. (2000): The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Crys. D*, 56: 115–128

[8] Frankenberg, N., Erskine, P.R., Cooper, J., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999): High resolution crystal structure of a magnesium-dependent 5-aminolevulinic acid dehydratase. *J. Mol. Biol.* 289: 591–602

[9] Frankenberg, N., Jahn, D., & Jaffe, E. (1999): *Pseudomonas aeruginosa* contains a novel type V porphobilinogen synthase with no required catalytic metal ions. *Biochemistry* 38: 13976–13982

[10] Frère, F., Schubert, W.-D., Stauffer, F., Frankenberg, N., Neier, R., Jahn, D., Heinz, D.W. (2002): Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluorolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism. *J. Mol. Biol.* 320: 237–247

Anhang 3

Tracking the Evolution of Porphobilinogen Synthase Metal Dependence *in vitro*

(Frere, F. *et al.*, 2004, *J Mol Biol*, akzeptiert zur Veröffentlichung)

JMB

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®



Tracking the Evolution of Porphobilinogen Synthase Metal Dependence *In Vitro*

Frederic Frère¹, Heike Reents¹, Wolf-Dieter Schubert², Dirk W. Heinz² and Dieter Jahn^{1*}

¹Institute of Microbiology
Technical University
Braunschweig
Spielmannstrasse 7, D-38106
Braunschweig, Germany

²Division of Structural Biology
German Research Center for
Biotechnology, Mascheroder
Weg 1, D-38124 Braunschweig
Germany

Metal ions are indispensable cofactors for chemical catalysis by a plethora of enzymes. Porphobilinogen synthases (PBGSs), which catalyse the second step of tetrapyrrole biosynthesis, are grouped according to their dependence on Zn^{2+} . Using site-directed mutagenesis, we embarked on transforming Zn^{2+} -independent *Pseudomonas aeruginosa* PBGS into a Zn^{2+} -dependent enzyme. Nine PBGS variants were generated by permutationally introducing three cysteine residues and a further two residues into the active site of the enzyme to match the homologous Zn^{2+} -containing PBGS from *Escherichia coli*. Crystal structures of seven enzyme variants were solved to elucidate the nature of Zn^{2+} coordination at high resolution. The three single-cysteine variants were invariably found to be enzymatically inactive and only one (D139C) was found to bind detectable amounts of Zn^{2+} . The double mutant A129C/D139C is enzymatically active and binds Zn^{2+} in a tetrahedral coordination. Structurally and functionally it mimics mycobacterial PBGS, which bears an equivalent Zn^{2+} -coordination site. The remaining two double mutants, without known natural equivalents, reveal strongly distorted tetrahedral Zn^{2+} -binding sites. Variant A129C/D131C possesses weak PBGS activity while D131C/D139C is inactive. The triple mutant A129C/D131C/D139C, finally, displays an almost ideal tetrahedral Zn^{2+} -binding geometry and a significant Zn^{2+} -dependent enzymatic activity. Two additional amino acid exchanges further optimize the active site architecture towards the *E. coli* enzyme with an additional increase in activity. Our study delineates the potential evolutionary path between Zn^{2+} -free and Zn^{2+} -dependent PBGS enzymes showing that the rigid backbone of PBGS enzymes is an ideal framework to create or eliminate metal dependence through a limited number of amino acid exchanges.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: crystal structure; evolution; metalloenzyme; porphobilinogen synthase; *Pseudomonas aeruginosa*

*Corresponding author

Abbreviations used: ALA, 5 aminolevulinic acid; PBG, porphobilinogen; PBGS, porphobilinogen synthase; β -ME, β -mercaptoethanol; PaPBGS, PBGS from *Pseudomonas aeruginosa*; EcPBGS, PBGS from *E. coli*; ScPBGS, PBGS from *Saccharomyces cerevisiae*; PaPBGS mutants: CXX, A129C; XCX, D131C; XXC, D139C; CCX, A129C/D131C; CXC, A129C/D139C; CCC, D131C/D139C; CCC, A129/D131C/D139C; CCCE, A129C/D131C/D139C/P132E; CCCER, A129C/D131C/D139C/P132E/K229R.

E-mail address of the corresponding author: d.jahn@tu-bs.de

Introduction

Porphobilinogen synthase (PBGS) is an essential constituent of the tetrapyrrole biosynthetic apparatus, present in the majority of known organisms. It catalyses the second step of this pathway, the asymmetric condensation of two molecules of 5-aminolevulinic acid (ALA) to yield the monopyrrolic product porphobilinogen (PBG) in a Knorr-type reaction^{1–5} (Figure 1). The active form of PBGS is a homo-octamer, as documented by crystal structures from *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa* (PaPBGS), *Escherichia coli* (EcPBGS)^{2,6–8} and *Homo sapiens* (PDB entry 1E51 and Breinig *et al.*⁹). Each monomer consists of a classical

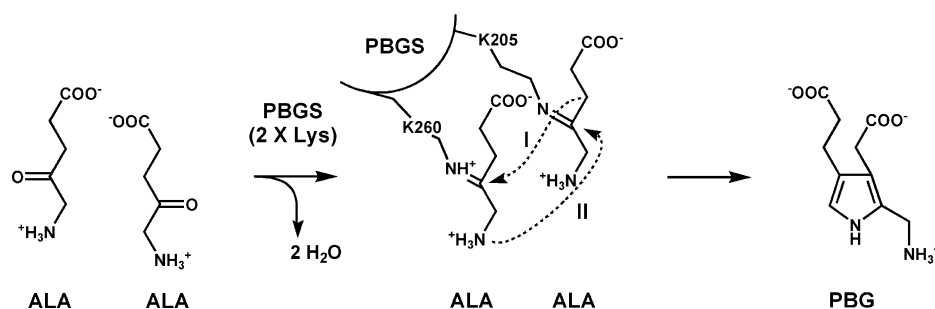


Figure 1. Enzymatic reaction catalyzed by PBGS during tetrapyrrole biosynthesis. Two molecules of ALA are condensed asymmetrically to form the pyrrole derivative PBG.

eight-stranded ($\beta\alpha$)₈-barrel.¹⁰ The active site, which is covered by a loop ("active site flap"), is situated at the C-terminal ends of the β -strands above the central barrel cavity. Three distinct binding sites for divalent cations (ZnA, ZnB and MgC) have been identified biochemically and structurally.¹¹ ZnA, found only in animal and fungal enzymes, is located near the active site flap but remote from the active site. ZnB is an integral component of the active site, positioned adjacent to the two lysine residues responsible for substrate binding (Figure 2). The allosteric site, MgC, situated in the monomer-monomer interface, has been implicated in controlling the active site flap and cross-talk between monomers within the octamer.⁷ In prokaryotes, both zinc-dependent and independent enzymes are found. A comparison of *Ec*PBGS and *Pa*PBGS indicates that the active sites differ by a mere five amino acid residues (*inter alia* three Zn²⁺-coordinating cysteine residues) while the protein backbone remains strikingly unaffected. Previously, Chauham & O'Brian¹² described the simultaneous introduction of three cysteine residues into the active site of *Bradyrhizobium japonicum* PBGS in order to convert this exclusively Mg²⁺-binding enzyme into a Zn²⁺-dependent PBGS. However, the enzymatic function of the PBGS mutant was only tested *via* genetic complementation studies and activity assays using cell-free extracts.

In our approach we investigated the stepwise introduction of the *Ec*PBGS ZnB-site into the active site of *Pa*PBGS by a mutagenesis approach, creating a set of nine *Pa*PBGS variants, allowing a delineation of the possible route of PBGS active site evolution.

Results

Rationale of the approach

To introduce the ZnB-binding site into *Pa*PBGS, three active-site residues (A129, D131, D139) of the enzyme, positionally corresponding to C119, C121 and C129 in *Ec*PBGS, were replaced by cysteine residues *via* site-directed mutagenesis. Initially, we created a set of three single amino acid exchange

mutants (A129C, D131C and D139C denoted CXX, XCX and XXC), three double mutants (A129C/D131C, A129C/D139C, D131C/D139C denoted CCX, CXC and XCC) and the triple mutant A129C/D131C/D139C (denoted CCC). To match the active site architecture of *Ec*PBGS yet more closely, two further exchanges, P132E and K229R, were introduced into the PBGS variant CCC to generate the mutant enzymes A129C/D131C/D139C/P132E (CCCE) and A129C/D131C/D139C/P132E/K229R (CCCER). CCCER perfectly mirrors the active site amino acid composition of *Ec*PBGS, while CXC contains the same set of potentially ZnB-forming residues (two cysteine residues and an aspartate) as found in the HemB sequence for *Mycobacterium tuberculosis* PBGS (*Mt*PBGS) (Figure 2). All *Pa*PBGS variants were produced recombinantly in *E. coli*, chromatographically purified and tested for enzymatic activity under anaerobic conditions to prevent oxidation of active site cysteine residues. The PBGS variants were characterized by SDS gel electrophoresis, gel permeation chromatography and mass spectrometry. Kinetic parameters and metal content of the PBGS variants were determined for all mutant proteins. Crystal structures of seven *Pa*PBGS mutants were determined at high resolution.

Zn²⁺-binding and Zn²⁺-dependent enzyme activity of the various *Pa*PBGS mutants

K_D values for Zn²⁺ and the occupancy of ZnB with Zn²⁺ in solution were determined for the various *Pa*PBGS mutants using equilibrium dialysis in combination with atomic absorption spectroscopy. Zn²⁺-occupancies were deduced from the solved crystal structures following crystallization in the presence of 1 mM Zn²⁺. Next we investigated whether and to what extent the introduction of cysteine residues into the active site of *Pa*PBGS causes the enzymatic reaction to become Zn²⁺-dependent. For that purpose proteins were first stripped of divalent cations as described in Materials and Methods and defined amounts of Zn²⁺ were then re-added. The kinetic parameters k_{cat} and K_{Mapp} were determined at the respective pH-optimum. As expected all enzyme variants

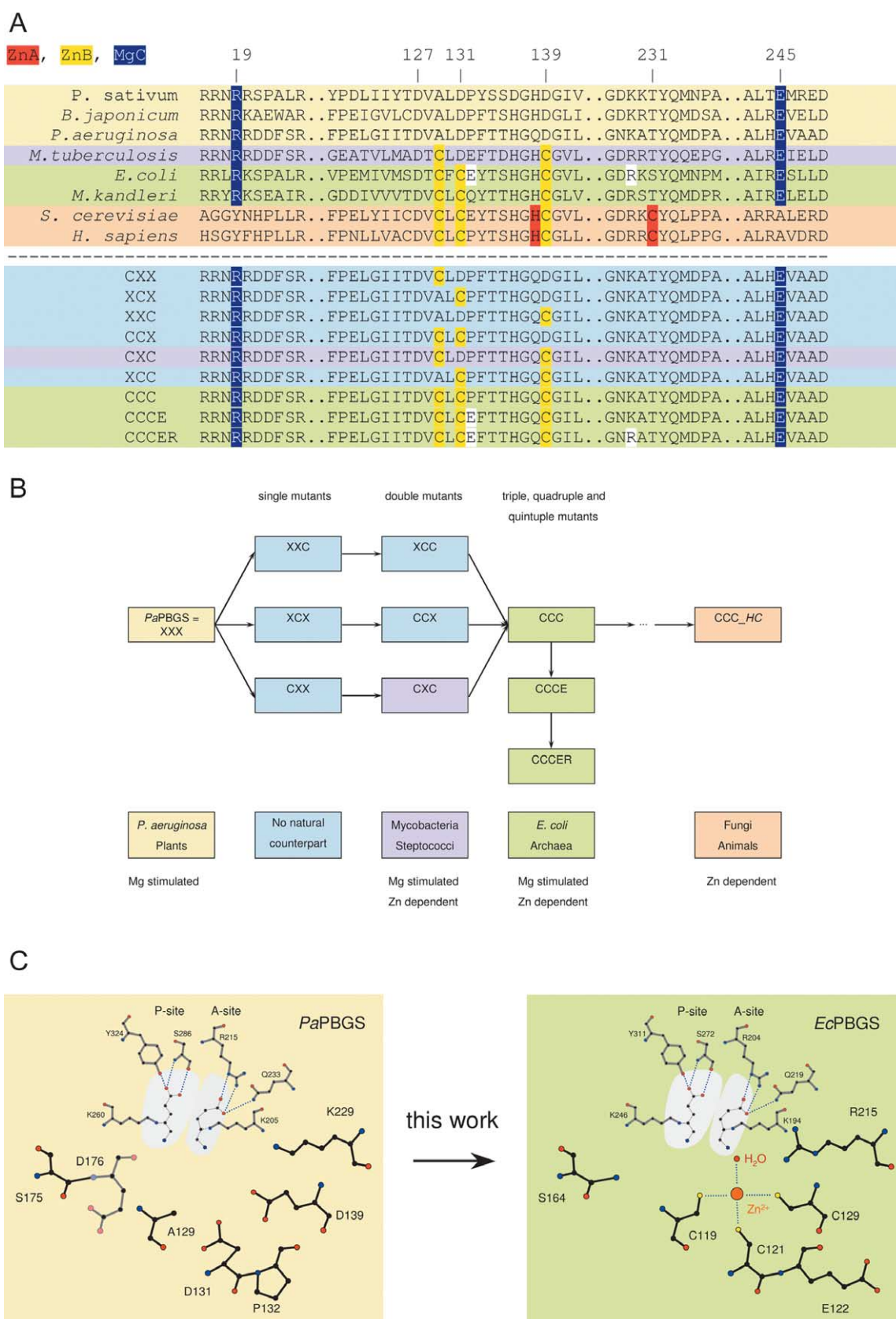


Figure 2. Known relationships of PBGS. (A) Sequence alignment of naturally occurring (above broken line) and mutant (below) PBGSs. The background color code for the amino acid sequences marks PBGS prototypes. A pale yellow background marks exclusively Mg^{2+} -containing enzymes; Mg^{2+} - and Zn^{2+} -binding enzymes are shown in purple (two cysteine residues in the active site) or green (three cysteine residues in the active site); while exclusively Zn^{2+} -binding PBGSs are shown in orange. Mutants without known natural counterpart are marked by a pale blue background. Amino acid numbering is based on the *P. aeruginosa* PBGS. Residues defining metal binding site ZnA, ZnB and MgC are marked

found to be active also responded to Mg^{2+} . Data are summarized in Table 1.

Of the three single mutants, CXX and XCX do not bind zinc, and coincidentally were the only proteins to that failed to yield diffraction quality crystals (see below). The third single mutant XXC binds Zn^{2+} with reasonable affinity (Table 1). All three single mutants are enzymatically inactive.

All three double mutants have significant Zn^{2+} -binding affinity. XCC, found to be enzymatically inactive, exhibits a K_D -value of 180 μM for Zn^{2+} with a maximum occupancy of about 0.3 Zn^{2+} per subunit under saturating conditions in solution. The remaining two double mutants CCX and the *Mt*PBGS-like CXC reveal significant Zn^{2+} -dependent PBGS activity of approximately 3.6% and 2.4% of *Pa*PBGS activity at 1 mM and 500 μM Zn^{2+} , respectively.

The three triple-cysteine mutants bearing *E. coli*-like Zn^{2+} -binding sites (CCC, CCCE and CCCER) bind Zn^{2+} with highest affinity, with estimated occupancies of 0.44 Zn^{2+} (CCCE) to 0.57 Zn^{2+} per subunit (CCC) in solution. The observed K_D -value of 7 μM for CCCE is very similar to that of *Ec*PBGS (6 μM ¹³). Extraction of Zn^{2+} by EDTA treatment was incomplete for CCC, CCCE and CCCER, resulting in a residual Zn^{2+} -content of about 0.2 Zn^{2+} per PBGS. The Zn^{2+} -occupancies determined using equilibrium dialysis are generally lower than those obtained from the crystal structures (Table 1). Such discrepancies have been reported for other PBGS species before.¹¹ They may be due to the differences in the experimental setup (solution versus crystal). CCC and CCCER are enzymatically active at Zn^{2+} -concentrations below 10 μM while CCCE only attains maximal activity above 50 μM Zn^{2+} . CCC is the least active of the three variants with approximately 5% of *Pa*PBGS activity. CCCE and CCCER, by contrast, attain 15% and 33% of *Pa*PBGS activity, respectively.

Thus, exclusively those PBGS mutants resembling naturally occurring PBGS enzymes show significant enzyme activity. The only exception is CCX, currently without a known natural counterpart. However, this variant requires high concentrations of Mg^{2+} (5 mM) for the detection of Zn^{2+} -dependent enzyme activity.

Two observations thus clearly emerge with respect to the kinetic parameters. Of the enzymatically active *Pa*PBGS mutants, the double mutants CCX and *Mt*PBGS-like CXC are the least active as judged by the corresponding k_{cat} -values. The

*Ec*PBGS-like mutants CCC, CCCE and CCCER are significantly more active. Enzyme activity, therefore, clearly correlates with the degree of similarity to the corresponding *Ec*PBGS active site architecture.

Crystal structures of mutant enzymes

Of the nine PBGS mutants, seven were amenable to X-ray crystallography; only mutants CXX and XCX failed to yield diffraction quality crystals. All mutants retain the same overall fold and only minor structural deviations from the wild-type *Pa*PBGS structure are observed. Remarkably, the asymmetry between the monomers within the dimeric enzyme, a pronounced feature of wild-type *Pa*PBGS,⁷ decreases with the number of mutations introduced, mirroring the lack of asymmetry in the *Ec*PBGS dimer.⁸ In the following sections we differentiate between monomers A and B only in mutants whose active sites differ significantly.

The active sites of mutants XXC, CCX (monomers A and B) and XCC are depicted in Figures 3 and 4. In each case, electron density best described as Zn^{2+} at low occupancy is observed in close proximity (<2.2 Å) to residues 129, 131 and 139. The cysteine, aspartic acid and water ligands of the metal ion adopt a distorted tetrahedral geometry. In mutant CCX the side-chain of D139 adopts two alternative conformations, both of which are observed in monomer A but only one in monomer B. The conformation exclusive to monomer A participates in Zn^{2+} -coordination, whereas the second (monomers A and B) does not but rather points away from the potential Zn^{2+} -site. The occupancy of Zn^{2+} in these structures (XXC and CCX) is estimated at a relatively low ~0.7, all crystals having been grown in the presence of 1 mM of Zn^{2+} . Slight structural rearrangements in the active site of mutant XCC similarly lead to a distorted tetrahedral Zn^{2+} -coordination sphere, and a low occupancy for Zn^{2+} (~0.5). Interestingly, only in this structure D176, located in the loop connecting βF with $\alpha 6$, exhibits two distinct side-chain conformations. In one of these conformations the carboxylic group of D176 contributes to the coordination sphere of the Zn^{2+} in ZnB.

All the crystal structures of the above-described mutants indicate that the introduction of one or two cysteine residues induces Zn^{2+} -binding at the expected site. Due to the unfavourable coordination sphere, however, Zn^{2+} -occupancy is relatively low.

in red, yellow and blue, respectively. The two additional active site residues differing between *Pa*PBGS and *Ec*PBGS (132, 229, *Pa*PBGS numbering) are marked in white. Variants of *Pa*PBGS are named to indicate the presence (C) or absence (X) as well as order of inserted cysteine residues 129, 131 and 139; e.g. CXX for mutant A129C. Mutations P132E and K229R are indicated by adding E or R to the name. (B) Schematic description of the steps required to convert Zn^{2+} -free *Pa*PBGS into the Zn^{2+} -dependent *Ec*PBGS. Naturally occurring PBGS homologues of the *Pa*PBGS mutants are noted in the bottom row. (C) Schematic representation of the active sites of *Pa*PBGS (yellow) and *Ec*PBGS (green). Residues depicted in dark grey coordinate the two substrate molecules (grey dotted lines based on the 5-fluorolevulinic acid in the complex *Pa*PBGS D139N/5F-LA³). Black residues define the ZnB-binding region in *Ec*PBGS, residues in dark grey here define additional conformations of a residue.

Table 1. Summary of properties of mutant enzymes

	ZnB presence, form	ZnB occupancy in crystal		K_D for Zn^{2+} (μM) ^a	Zn^{2+} -occupancy in solution per monomer	Activity		k_{cat}/K_{Mapp} ($s^{-1} M^{-1}$)	Response to		pH optimum ^c
		mon A	mon B			k_{cat} (s^{-1})	K_{Mapp} (mM)		Mg^{2+}	Zn^{2+} ^b	
<i>Pa</i> PBGS	–	–	–	n.d.	n.d.	0.84	0.4	2100	+	–	8.5
CXX	No crystal structure	–	–	> 10,000	n.d.	< 0.001% ^d	–	–	–	–	n.d.
XCX	No crystal structure	–	–	n.d.	n.d.	< 0.001% ^d	–	–	–	–	n.d.
XXC	+ Distorted	0.5	0.5	302	0.44	< 0.001% ^d	–	–	–	–	n.d.
CCX	+ Distorted	0.7	0.7	860	0.31	0.03	1.69	17.8	+	(+) ^e	8.0
XCC	+ Distorted	0.5	0.5	180	0.29	< 0.001% ^d	–	–	–	–	n.d.
CXC	+ Tetrahedral	0.9	0.9	450	0.59	0.02	2.18	9.2	+	+	7.5
<i>“MHPBGS”</i>											
CCC	+ Tetrahedral	1.0	0.9	78	0.57	0.044	0.24	183.3	+	+	7.6
CCCE	+ Tetrahedral	0.85	0.85	7	0.56	0.12	0.12	1000	+	+	8.5
CCCER	+ Tetrahedral	0.85	0.85	85	0.44	0.29	1.20	241.7	+	+	8.8
<i>Ec</i> PBGS	+ Tetrahedral	1.0	1.0	6 ^f	n.m.	0.47	0.1 ^g	4700	+	+	8.2

n.d., not detectable.

^a Errors lie between 10% and 50% of the respective values.^b + indicates response to the metal ion, – indicates no detectable activity under these reconstitution conditions.^c pH optimum of weakly active enzymes not determined.^d Of wild-type activity.^e Responded to Zn^{2+} only in the presence of 5 mM Mg^{2+} .^f Derived from Spencer & Jordan.¹³^g Derived from Senior *et al.*²⁶

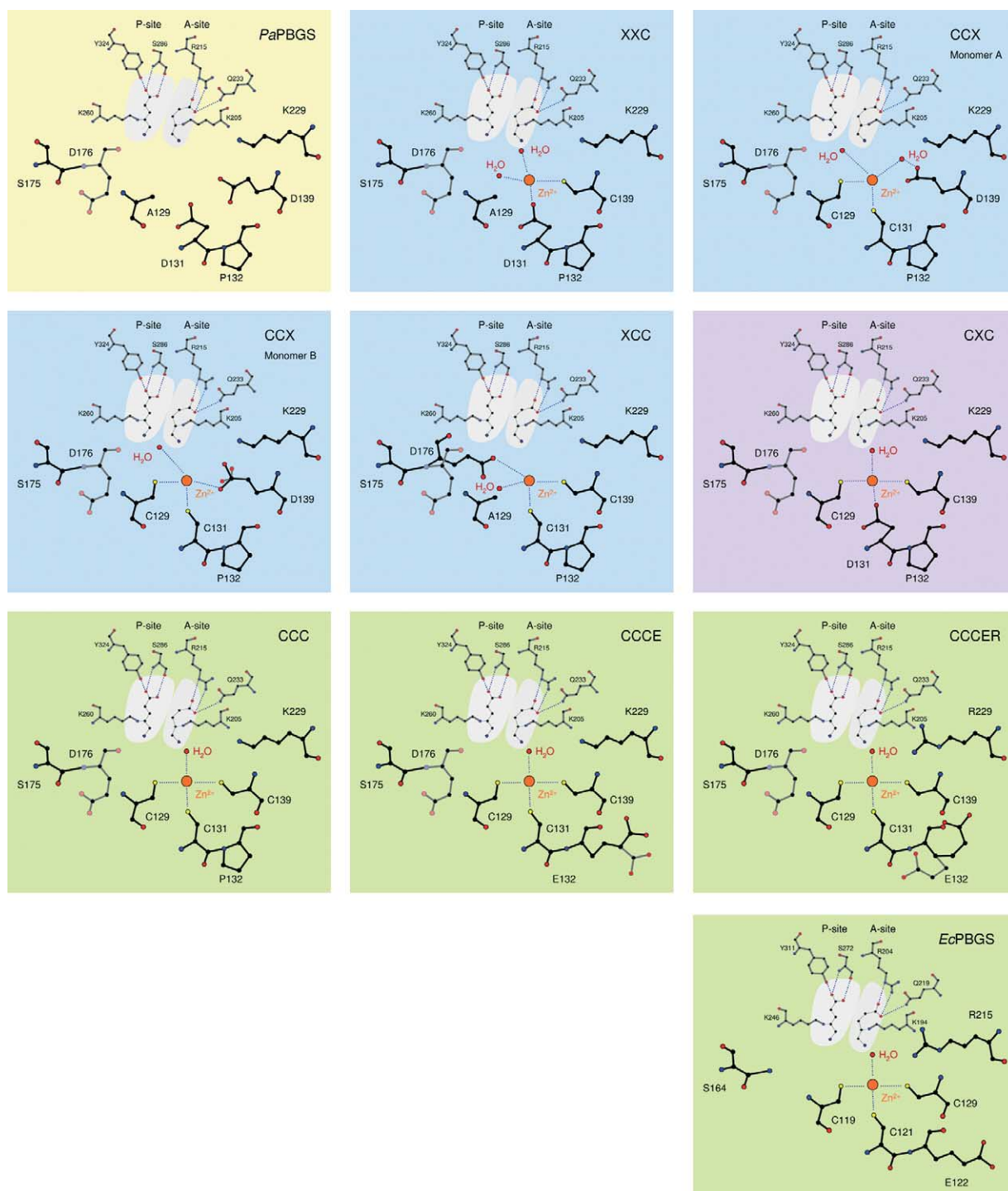


Figure 3. Schematic representation of the active sites of crystallized mutant enzymes delineating the transition of *PaPBGS* to the Zn^{2+} -binding, *EcPBGS*-like mutant CCC. Residue, substrate and background color coding is identical to Figure 2.

Consequently, no significant Zn^{2+} -dependent enzyme activity was observed, except for the mutant CCX with an activity of about 3% compared to WT *PaPBGS*. A superposition of these mutant structures with *EcPBGS* (Figure 5) indicates the degree of distortion of these Zn^{2+} binding sites.

The active sites of PBGS variants related to naturally occurring PBGSs, like *MtPBGS* (CXC)

and *EcPBGS* (CCC, CCCE, CCCER), are also depicted in Figures 3 and 4. These mutants combine an almost ideal tetrahedral Zn^{2+} -coordination sphere with high Zn^{2+} -occupancy (~ 0.85 to 1.0). Coordinating residues exclusively exhibit single conformations. The superposition of CCC, CCCE and CCCER upon *EcPBGS* (Figure 5) confirms the successful introduction of ZnB into the active site of

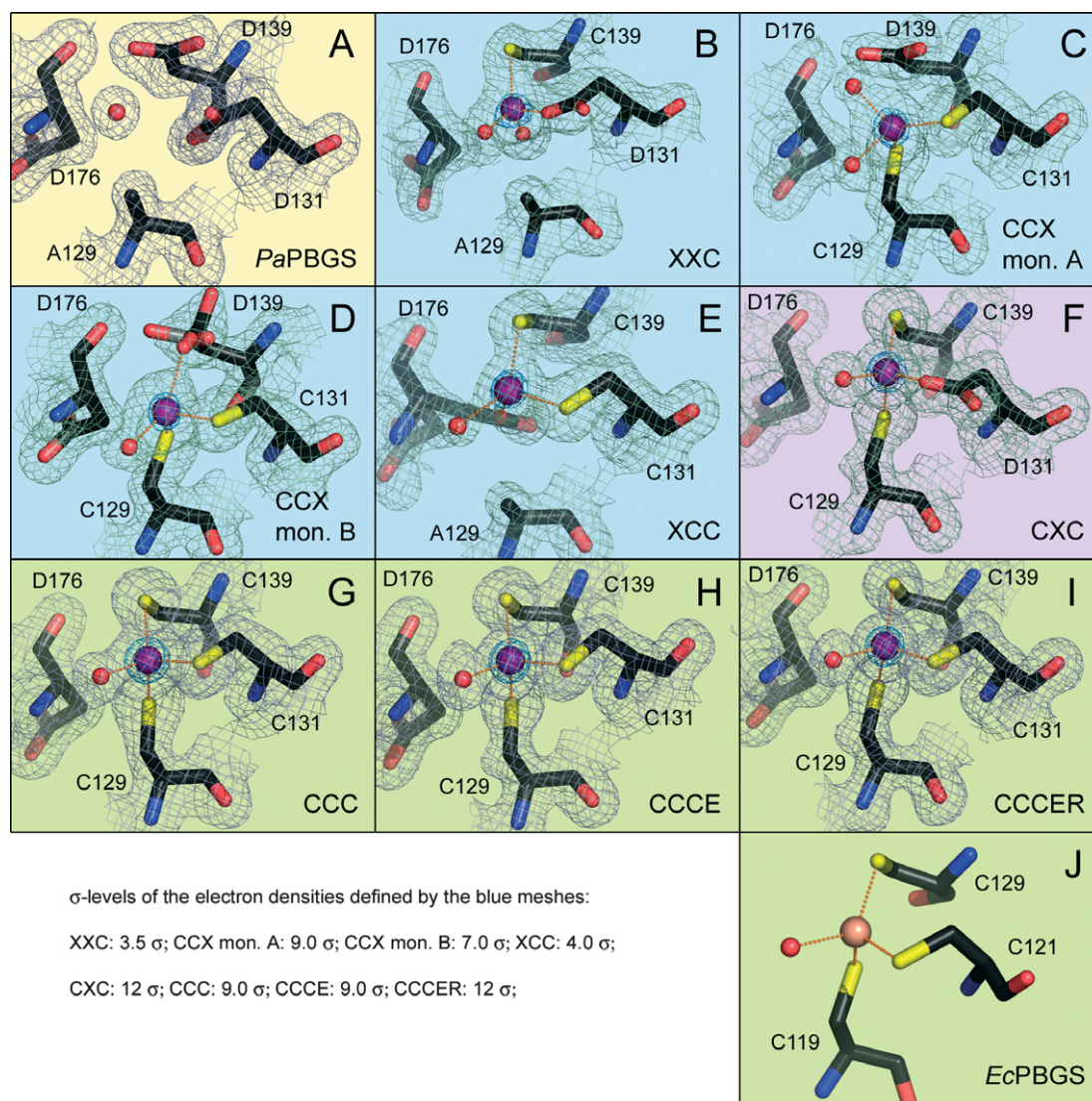


Figure 4. Overview of the metal binding site ZnB in *PaPBGS* (cream-colored background), *EcPBGS* (green) and the engineered variants of *PaPBGS* (blue, purple and green). The final $2F_o - 2F_c$ electron densities are contoured at 1.0 σ (grey mesh) and at higher σ -values (blue mesh) defining the position of the Zn^{2+} . The σ -values vary according to resolution and Zn^{2+} -occupancy. Water molecules are shown as red spheres, Zn^{2+} as purple or orange spheres. Residue, substrate and background color coding is identical to Figure 2.

PaPBGS. In agreement with these structural data only these mutants exhibit a significant and exclusive Zn^{2+} -dependent enzymatic activity. In variant CCCE, P132 was replaced by glutamate and in CCCER additionally K229 by arginine to further approach the active site of *EcPBGS*. P132 is located near the N terminus of the active site flap, while K229 is part of the flap. In the crystal structures of CCCE and CCCER, E132 adopts two alternative conformations (Figure 4) both different from that in *EcPBGS*. Also, R229 of CCCER is partly disordered in contrast to K229 in *PaPBGS* (Figure 5). Correspondingly, the active site flaps retain the disordered, “open” conformation. In the *PaPBGS*, K229 serves to anchor this loop.⁷ Possibly the replacement of this residue destabilizes the flap causing R229 to adopt a slightly shifted position of its C-terminal part in CCCER compared to *PaPBGS*.

The structural consequences of “transplanting” these two residues are thus more complex than anticipated. Nevertheless an improved catalytic activity (k_{cat}) compared to mutant CCC is observed for both mutants (see above).

Discussion

The present study was undertaken to explore the potential evolutionary path connecting Zn^{2+} -free PBGS from *P. aeruginosa* (*PaPBGS*) with the functionally equivalent Zn^{2+} -dependent PBGS from *E. coli*. (*EcPBGS*) (Figure 2(C)). Less than five amino acid exchanges in the active site were required to functionally convert *PaPBGS* into *EcPBGS*. Interestingly, the variant CXC, resembling PBGS from *Mycobacteria* (*MtPBGS*) is located half

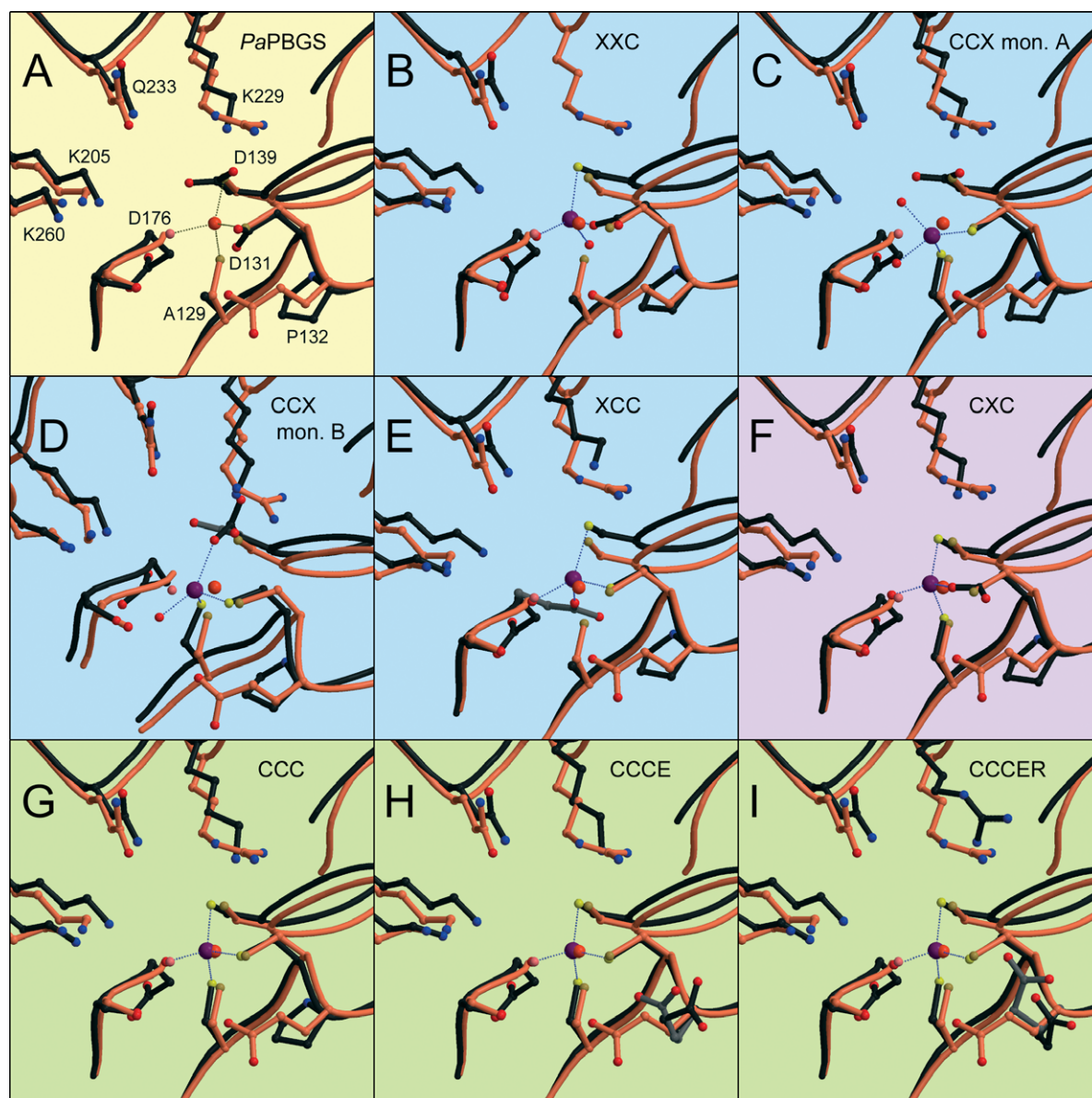


Figure 5. The active site residues of *PaPBGS* and engineered *PaPBGS* variants (dark grey) superimposed on those of *EcPBGS* (orange). Residue, substrate and background color coding is identical to Figure 2. The Zn^{2+} of the *PaPBGS* mutants is colored in purple, the Zn^{2+} of the *EcPBGS* is colored in orange.

way between both active site conformations (Figure 2(B)). CXC is enzymatically active and Zn^{2+} -dependent, indicating that *MtPBGS* may similarly be Zn^{2+} -dependent. Of the nine mutants generated, five do not have a known natural equivalent, namely the single mutants CXX, XCX and XXC and the double mutants CCX and XCC. All except CCX are inactive. CXX and XCX, furthermore, did not yield crystals suitable for structure determination. This indicates that the folding and the active site architecture of these mutants are affected by the introduced mutations, which very likely also accounts for the loss of activity. XXC and XCC have moderate Zn^{2+} -binding affinities but the tetrahedral Zn^{2+} -coordination sphere is strongly distorted and the active-site Zn^{2+} -occupancy in the

corresponding crystal structures is low. The only active though not naturally occurring mutant CCX also has a strongly distorted Zn^{2+} -coordination site and low Zn^{2+} -occupancy in the crystal. Zn^{2+} -dependent activity of this mutant requires unusually high Mg^{2+} -concentrations. This variant therefore, does not behave like a typical Zn^{2+} -dependent PBGS. Zn^{2+} -dependent are the four variants CXC, CCC, CCCE and CCCER, with activities ranging from 2.5% to 33% of wild-type *PaPBGS* activity (k_{cat}). These observations provide strong evidence that the highly conserved rigid backbone of the PBGS enzyme class provides the structural basis for the generation of various active site architectures with a very limited number of amino acid exchanges. The turn-over numbers (k_{cat})

of the *Pa*PBGS variants CXC, CCC, CCCE and CCCER increase with the degree of similarity of the corresponding active site to the *Ec*PBGS active site. Interestingly, the specificity constants $k_{\text{cat}}/K_{\text{Mapp}}$ do not completely follow this trend. For variant CCCER a lower value for $k_{\text{cat}}/K_{\text{Mapp}}$ compared to CCCE was obtained due to a higher K_{Mapp} value. Residue R229 was found partly disordered in the crystal structure of CCCER with a slightly shifted position compared to the corresponding K229 in *Pa*PBGS and CCCE. This distortion might contribute to the elevated K_{Mapp} -value of CCCER, as this residue is directly involved in the binding of the substrate to the A-site. Presumably additional amino acid exchanges are necessary to further develop CCCER towards an enzyme that truly resembles *Ec*PBGS. For example the amino acid composition of the active site flap where K229 or R229 are situated differs significantly between the *Pa*PBGS variants and *Ec*PBGS. Further directed evolution of CCCER in order to improve the specificity constant might provide additional insights into the structural basis of the protein dynamics required for optimal catalysis.

The above findings mainly agree with results obtained by Cauham *et al.*¹² In their approach for the introduction of ZnB into the solely Mg^{2+} -dependent *B. japonicum* PBGS, Zn^{2+} dependence of enzyme activity in cell-free extract was achieved. However, a loss of the Mg^{2+} -dependence of this hybrid enzyme was observed.

Potential evolutionary route

Based on the functional and structural data of the nine mutants of *Pa*PBGS, we propose a possible route of evolution linking Zn^{2+} -dependent and Zn^{2+} -independent active sites in the PBGS family. We were able to create a functional Zn^{2+} -binding site in *Pa*PBGS by exchanging either two (CXC) or three amino acid residues (CCC). The Zn^{2+} -binding sites thereby generated are positionally identical to that of *Ec*PBGS. Adjustment of the peptide backbone was not required to accommodate the large metal ion within the active site. It would appear quite unlikely that both the backbone and residues A129, D131, and D139 in *Pa*PBGS are serendipitously located in a way to allow two or three residues to be replaced by cysteine and perfect Zn^{2+} -coordination within the active site without changing the protein backbone or obstructing substrate binding. These structural settings thus support the hypothesis, first formulated by Jaffe,¹⁴ that a Zn^{2+} -less PBGS evolved from a Zn^{2+} -binding ancestor.

Apart from *P. aeruginosa*, plants, phototrophic bacteria like the *Rhodobacteriaceae* and plant-associated bacteria like *Bradyrhizobia* possess a Zn^{2+} -free PBGS. The high affinity of protoporphyrin IX for Zn^{2+} is known to inhibit the insertion of Mg^{2+} during chlorophyll maturation,¹⁵ indicating that the onset of photosynthesis, therefore, may have provided the evolutionary pressure to reduce the

utilization of Zn^{2+} by such organisms and in particular in PBGS.

A possible route to create Zn^{2+} -free PBGS proceeds *via* gene duplication and the parallel evolution of two PBGS enzymes within one organism. This assumption is sustained by the occurrence of two PBGS genes in *Nostoc sp. PCC 7120*,¹⁴ one coding for a ZnB carrying enzyme, the other for a Zn^{2+} -free PBGS. Alternatively, evolution may have proceeded *via* a Zn^{2+} -dependent enzyme with only two cysteine ligands, as observed in *Mycobacterium tuberculosis*. Subsequently a double mutation would lead to a cysteine-free and therefore Zn^{2+} -independent enzyme. Finally, a combination of both strategies is also thinkable.

Materials and Methods

Mutagenesis and protein production

Amino acid residues of *Pa*PBGS were replaced by mutating the *P. aeruginosa hemB* gene previously inserted into the expression vector pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany), using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, USA). *Pa*PBGS mutants were produced and purified as described.^{3,16} Primers to generate the *Pa*PBGS variant CXX were GACGTGTGCTCGACCCGTTACACC (sense), GGTGGTGAACGGGTCGAGGCACACGTC' (antisense); for XCX: GACGTGGCGCTCTGCCCGTTCA CCACCCATG (sense), CATGGGTGGTGAACGGGCAG AGCGCCACGTC (antisense); for XXC: CCACCCATGGC CAGTGGCGCATCTGGATG (sense), CATCCAGGAT GCCGCACTGGCCATGGGTGG (antisense); for CCX: GACGTGTGCTCTGCCCGTTACCCATGGC (sense), GCCATGGGTGGTGAACGGGCAGAGGCACA CGTC (antisense). Individual mutations were combined to generate double and triple variants. For CCCE the primers GTGGCGCTCGACGAGTTCACCACCCATGGC (sense) and GCCATGGGTGGTGAACCTCGCAGAGGCA CAC (antisense) were combined with the gene of CCC; for CCCER the primers GGCAAGGGCAACCGGGCCA CCTACCAG (sense) and CTGGTAGGTGGCCCGGTG CCCTTGCC (antisense) were used.

Determination of pH-dependent PBGS activity

To characterize the pH-dependent PBGS activity of the mutants CCC, CCCE and CCCER, 200 μl PBGS mutant solution (CCC, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CCCE, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CCCER, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in reaction buffer (1 mM MgCl_2 , 10 μM ZnCl_2 , 20 mM β -mercaptoethanol and 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol (for pH 10.0–9.25), bis-Tris-propane (pH 9.0–6.75), bis-Tris (pH 6.5–6.0) or Na-Mes (pH 5.0–6.0)) were mixed with 200 μl of ALA solution (CCC, 0–8 mM; CCCE, 0–32 mM; CCCER, 0–96 mM ALA in reaction buffer). Both protein and ALA solutions were preheated to 37 °C. Reactions were allowed to proceed for 10–30 minutes. Observed activities at the chosen pH determined total incubation times. An aliquot of 350 μl of the reaction mixture was added to 350 μl of stop solution (25% (v/v) trichloroacetic acid plus 100 mM HgCl_2). The resulting solution was centrifuged for five minutes at 5500g. The resulting supernatant of 450 μl were mixed with 450 μl of Ehrlich's reagent (20 ml acetic acid 100% (v/v), 20 ml perchloric acid 60% (w/v) and 800 mg

p-dimethylaminobenzaldehyde) and incubated for ten minutes. PBG formation was monitored at 555 nm ($\epsilon_{555}=60,200\text{ M}^{-1}$). The kinetic data obtained for the PBGS variants CCC, CCCE and CCCER were fitted using classical Michaelis–Menten kinetics. The ratio $k_{\text{cat}}/K_{\text{Mapp}}$ was plotted against the pH. Data were fitted against the equation $y = y_{\text{max}}/((10^{-\text{pH}}/10^{-a}) + (10^{-b}/10^{-\text{pH}}) + 1)$ using the regression wizard of Sigmaplot 8 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) where *a* and *b* represent pK_{a1} the pK_{a2} , respectively. pH-dependence of CCX and CXC was tested in a single point experiment. PBG formation was tested in triplicate for both enzymes after ten minutes and 30 minutes for pH-values from 6.75 to 9.0 with 8 mM ALA as substrate.

The pH-dependence of CCX and CXC was tested. For this purpose PBG formation was determined in triplicate for both enzymes after ten minutes and 30 minutes for pH-values from 6.75 to 9.0 with 8 mM ALA as substrate. PBGS mutant of 200 μl (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in reaction buffer (100 mM bis-Tris-propane (pH 6.75–9.0), 1 mM MgCl_2 (for CXC, 5 mM for CCX), 10 μM ZnCl_2 and 20 mM β -mercaptoethanol) were mixed with 200 μl of ALA (8 mM in reaction buffer). Both protein and ALA solutions were preheated to 37 °C. Reactions were allowed to proceed for ten and 30 minutes. Reaction termination and PBG determination were performed as described above. To determine the k_{cat} and K_{Mapp} the following procedure was repeated at pH 7.5 for CXC and pH 8 for CCX. To start the enzyme reaction, 200 μl of PBGS mutant (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in reaction buffer (100 mM bis-Tris-propane pH 7.5 (CXC) or 8.0 (CCX), 1 mM MgCl_2 (CXC) or 5 mM (CCX), 10 μM ZnCl_2 and 20 mM β -mercaptoethanol) were mixed with 200 μl of ALA solution (0–24 mM ALA in reaction buffer). Both protein and ALA solutions were preheated to 37 °C. Reactions were allowed to proceed for 30 minutes. The rest of the procedure was performed as described above.

Zn²⁺-dependence

Protein solutions (1 ml, 2 mg/ml) were stripped of divalent cations by dialyzing against 500 ml buffer D (50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl_2 (5 mM for CCX), 10 mM β -mercaptoethanol) including 20 mM Na–EDTA for four hours, followed by three dialyzing steps against buffer D without EDTA, two hours each.

PBGS mutant solutions of 200 μl (CCC, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CCCE, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CCCER, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 100 mM bis-Tris-propane (pH 7.5), 10 mM β -mercaptoethanol were mixed with 0–200 μl of 9.6 mM MgCl_2 or 480 μM ZnCl_2 and the total volume adjusted to 400 μl with reaction buffer. The mixture was incubated at 37 °C for 30 minutes. To start the enzymatic reaction, 200 μl of ALA solution (for PBGS variant CCC 12 mM, for CCCE 24 mM and for CCCER 72 mM) in 100 mM bis-Tris-propane, pH 7.5) was added and stopped after 90 minutes (for variant CCC) or 30 minutes (for variants CCCE and CCCER) by addition of 600 μl of stop-solution. The resulting solution was centrifuged for five minutes at 5500g. Volumes of 500 μl of the resulting supernatant were mixed with 500 μl of Ehrlich's reagent and incubated for ten minutes. PBG formation was determined as described above.

Equilibrium dialysis

*Pa*PBGS mutant solution of 1 ml (1 mg/ml) was dialyzed in a dialyzing knob (Roth, Karlsruhe, Germany) against 500 ml buffer D (see above) including 10 mM Na–EDTA for two hours followed by three dialyzing steps

against buffer D without EDTA, each two hours. Finally, the solution was dialyzed overnight against buffer D including ZnCl_2 in concentrations between 1 μM and 1000 μM . Resulting protein solutions were desalted on an ÄKTA FPLC system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) using two 5 ml HiTrap Desalting columns in-line (buffer D without Zn^{2+}). Protein concentration was determined by absorption spectroscopy at 280 nm. Enzyme-bound Zn^{2+} was determined by atomic absorption spectroscopy (Perkin-Elmer AAS 3100). The data were fitted against the equation $n = n_0 + (n_1 \times [\text{Zn}^{2+}])/(K_D + [\text{Zn}^{2+}])$ using the regression wizard of Sigmaplot 8 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany), where *n* represents the number of Zn^{2+} per subunit, *n*₀ is the residual number of Zn^{2+} per subunit, *n*₁+*n*₀=maximal number of Zn^{2+} per subunit.

Crystallization and structure determination

Purified PBGS mutants were dialyzed against 50 mM Na–Hepes (pH 7.5) or 50 mM Tris–HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 100 μM ZnCl_2 and concentrated to 10 mg/ml. Crystallization lead conditions were identified using Crystal Screen™ and Crystal Screen 2™ (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) sparse matrix screens in 96-well sitting-drop CrystalClear strip racks (Douglas Instruments, UK) and 3 ml reservoir plus 3 ml protein solution drops. In parallel, known crystallization conditions of WT *Pa*PBGS⁷ were optimized by hanging-drop vapor diffusion method employing 5 μl protein plus 5 μl reservoir solution. Reservoir solution included 27–33% (v/v) PEG 400, 50–1000 mM MgCl_2 and 100 mM Na–Hepes (pH 7.5).

Square tile-like crystals (300 $\mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$) grew after up to 15 weeks. For crystallization conditions see Table 2. Crystals were transferred to a cryoprotective solution (XXC, CCX, CXC and XCC, 10% PEG 400+90% respective reservoir solution; CCCER, 15% PEG 400+85% respective reservoir solution; CCC, 20% PEG 400+80% respective reservoir solution; CCCE, 20% glycerol +80% respective reservoir solution) for ten seconds and flash-frozen in liquid nitrogen. Data collection was performed at 100 K using CuK_α radiation and a Rigaku-MSR R-Axis IV++ image plate or synchrotron radiation (DESY Hamburg, beamline BW6, $\lambda=1.05\text{ \AA}$) and a MARCCD detector (Table 2). The crystals are isomorphous to those of *Pa*PBGS⁷ (PDB code 1b4k) so that structures were solved by difference Fourier techniques using rigid body and simulated annealing protocols in CNS¹⁷ and manual model building in O.¹⁸ Refinement was completed using REFMAC5¹⁹ and ARP/WARP.²⁰ Structure quality was verified by PROCHECK²¹ and WhatIf.²² Overlays of mutant *Pa*PBGS with *Ec*PBGS (ID code: 1I8J) were generated using LSQKAB.^{23,24}

Figures

Figures were created using PyMOL (DeLano Scientific) and MOLSCRIPT.²⁵

Protein Data Bank accession numbers

Atomic coordinates have been deposited in the RCSB Protein Data Bank with accession codes as listed in Table 2.

Table 2. Crystallographic data

Mutants	XXC	CCX	XCC	CXC	CCC	CCCE	CCCEr
<i>Structure determination</i>							
Space group	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2	<i>P</i> 4 ₂ ,2
Cell dimensions: <i>a</i> ; <i>b</i> ; <i>c</i> (Å)	125.2; 125.2; 86.0	126.3; 126.3; 85.6	125.3; 125.3; 85.8	126.3; 126.3; 85.2	127.0; 127.0; 85.4	127.0; 127.0; 86.4	125.7; 125.7; 85.5
Total reflections ^a	442,530	328,504	440,803	583,843	857,583	661,937	1,270,070
Unique reflections	35,228	75,220	81,768	90,595	59,936	101,482	132,918
Resolution range (Å) ^b	47.1–2.20 (2.28–2.20)	20.0–1.70 (1.76–1.70)	20.0–1.65 (1.71–1.65)	20.0–1.60 (1.63–1.60)	20.0–1.85 (1.88–1.85)	20.0–1.55 (1.61–1.55)	20.0–1.40 (1.45–1.40)
Completeness (%) ^b	99.8 (99.5)	98.5 (98.0)	99.4 (99.0)	99.9 (100)	100 (100)	99.0 (99.0)	99.3 (100)
Redundancy ^b	12.6 (11.8)	4.3 (4.3)	5.4 (5.1)	6.4 (6.1)	14.3 (14.6)	6.7 (6.2)	9.6 (9.5)
<i>R</i> _{merge} ^c	10.1 (44.6)	5.2 (32.8)	4.7 (36.0)	5.0 (27.8)	9.9 (31.3)	8.1 (49.9)	5.8 (56.3)
<i>I</i> / <i>σ</i> _{<i>I</i>}	23.1 (5.3)	17.8 (3.2)	20.5 (3.1)	32.7 (5.5)	29.6 (9.3)	16.0 (3.8)	27.9 (5.7)
Temperature factor (Å ²)	30.4	20.8	20.8	15.7	21.5	19.6	15.6
<i>Refinement</i>							
Resolution range used for refinement (Å) ^d	87.7–2.2	87.7–1.7	87.7–1.65	87.7–1.60	87.7–1.85	87.7–1.5	87.7–1.4
Reflections ^a	33,396	71,529	76,946	85,549	56,718	94,390	123,617
Non-H protein atoms/dimer	5297	5503	5444	5542	5299	5354	5392
Solvent molecules/dimer	304	693	627	887	654	532	619
Ions/dimer: Na ⁺ ; K ⁺ ; Mg ²⁺ ; Zn ²⁺ ; Cl [−]	−; 2; 2; 2; −	−; 2; 3; 2; −	2; −; 3; 2; 1	−; −; 7; 2; 2	−; 2; 2; 2; −	−; 2; 2; 2; −	2; −; 5; 2; −
Average <i>B</i> -factor (Å ²)	30.84	18.92	19.90	14.20	20.09	18.15	16.30
<i>R</i> -factor (%); <i>R</i> _{free} (%) ^e	15.38; 21.69	13.80; 18.16	15.06; 18.77	12.92; 16.49	13.14; 17.56	15.73; 18.51	14.68; 17.28
Ramachandran plot ^f : most favoured regions; additionally allowed; generously allowed (%)	93.0; 7.0; 0.0	93.5; 6.3; 0.2	93.6; 6.4; 0.0	93.2; 6.8; 0.0	93.2; 6.5; 0.3	93.3; 6.7; 0.0	94.0; 6.0; 0.0
R.m.s. deviation from ideality: bond lengths (Å); bond angles (deg.) ^g	0.026; 2.028	0.025; 2.16	0.027; 2.146	0.024; 2.094	0.024; 2.038	0.015; 1.628	0.025; 2.074
Estimate overall coordinate error, based on maximum likelihood (Å)	0.12	0.05	0.04	0.06	0.06	0.04	0.03
PDB code	1w54	1w56	1w5m	1w5n	1w5o	1w5p	1w5q

^a > 1 σ .

^b Value for shell of highest resolution in parentheses.

^c $R_{\text{merge}} = 100(\sum_{h,i} |I_{h,i} - \bar{I}_h| / \sum_{h,i} I_{h,i})$, where summation is over all observations $I_{h,i}$ contributing to the reflection intensities I_h .

^d F_c for range 87.71–20.0 Å.

^e 5% of data were omitted from refinement.²⁷

^f Calculated using PROCHECK.²¹

^g Calculated using Whatif.²²

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and Fonds der Chemischen Industrie to D.J. and D.W.H. Synchrotron data were collected at beamline BW6 at DESY, Hamburg, Germany.

References

- Neier, R. (1996). Chemical synthesis of porphobilinogen and studies of its biosynthesis. *Advan. Nitrogen Heterocycles*, **2**, 135–146.
- Erskine, P. T., Norton, E., Cooper, J. B., Lambert, R., Coker, A., Lewis, G. *et al.* (1999). X-ray structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* complexed with the inhibitor levulinic acid at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **38**, 4266–4276.
- Frere, F., Schubert, W. D., Stauffer, F., Frankenberg, N., Neier, R., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2002). Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluorolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism. *J. Mol. Biol.* **320**, 237–247.
- Goodwin, C. E. & Leeper, F. J. (2003). Stereochemistry and mechanism of the conversion of 5-aminolevulinic acid into porphobilinogen catalysed by porphobilinogen synthase. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1443–1446.
- Erskine, P. T., Coates, L., Butler, D., Youell, J. H., Brindley, A. A., Wood, S. P. *et al.* (2003). X-ray structure of a putative reaction intermediate of 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* **373**, 733–738.
- Erskine, P. T., Senior, N., Awan, S., Lambert, R., Lewis, G., Tickle, I. J. *et al.* (1997). X-ray structure of 5-aminolaevulinic acid dehydratase, a hybrid aldolase. *Nature Struct. Biol.* **4**, 1025–1031.
- Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999). High resolution crystal structure of a Mg^{2+} -dependent porphobilinogen synthase. *J. Mol. Biol.* **289**, 591–602.
- Erskine, P. T., Newbold, R., Roper, J., Coker, A., Warren, M. J., Shoolingin-Jordan, P. M. *et al.* (1999). The Schiff base complex of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase with laevulinic acid. *Protein Sci.* **8**, 1250–1256.
- Breinig, S., Kervinen, J., Stith, L., Wasson, A. S., Fairman, R., Wlodawer, A. *et al.* (2003). Control of tetrapyrrole biosynthesis by alternate quaternary forms of porphobilinogen synthase. *Nature Struct. Biol.* **10**, 757–763.
- Reardon, D. & Faber, G. K. (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* **9**, 497–503.
- Jaffe, E. K. (2000). The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Crystallog. sect. D Biol. Crystallog.* **56**, 115–128.
- Chauhan, S. & O'Brian, M. R. (1995). A mutant *Bradyrhizobium japonicum* delta-aminolevulinic acid dehydratase with an altered metal requirement functions *in situ* for tetrapyrrole synthesis in soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* **270**, 19823–19827.
- Spencer, P. & Jordan, P. M. (1993). Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. *Biochem. J.* **290**, 279–287.
- Jaffe, E. K. (2003). An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem. Biol.* **10**, 25–34.
- Jaffe, E. K. (1995). Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 169–179.
- Frankenberg, N., Heinz, D. W. & Jahn, D. (1999). Production, purification, and characterization of a Mg^{2+} -responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **38**, 13968–13975.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, R. W., W. *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D Biol. Crystallog.* **54**, 905–921.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110–119.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallog. sect. D Biol. Crystallog.* **53**, 240–255.
- Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.* **6**, 458–463.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283–291.
- Hoof, R. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature*, **381**, 272.
- Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D Biol. Crystallog.* **50**, 760–763.
- Kabsch, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallog. sect. A*, **32**, 922–923.
- Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **24**, 946–950.
- Senior, N. M., Brocklehurst, K., Cooper, J. B., Wood, S. P., Erskine, P., Shoolingin-Jordan, P. M. *et al.* (1996). Comparative studies on the 5-aminolaevulinic acid dehydratases from *Pisum sativum*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **320**, 401–412.
- Brünger, A. T. (1992). Free R-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472–475.

Edited by M. Guss

(Received 14 September 2004; received in revised form 15 October 2004; accepted 17 October 2004)

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Jahn, natürlich für das interessante Thema und die gute Betreuung, vor allem aber auch für die fruchtbare, kollegiale Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, die entscheidend von Chef geprägt wird.

Mein nächster Dank gilt Prof. Dr. Dirk Heinz, denn die Betreuung meiner Arbeit lastete zu einem guten Teil auch auf seinen Schultern und vor allem in unsere gemeinsamen Veröffentlichungen hat er viel Schweiß und Arbeit investiert. Auch für die offenen Gespräche möchte ich mich bedanken.

Und wenn ich von viel Arbeit und viel Betreuung spreche dann muss mein nächstes dickes Dankeschön selbstverständlich an Dr. Wolf-Dieter-Schubert gehen, der mich mit großer Geduld alles gelehrt hat, was ich heute über Röntgenstrukturanalyse weiß und manches andere mehr.

Die erste Hälfte dieser Doktorarbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Hithilfe von Prof. Dr. Reinhard Neier, in dessen Arbeitsgruppe ich kinetische Messmethoden erlernen durfte und der uns darüber hinaus die getesteten Inhibitoren zur Verfügung gestellt hat.

Dass ich mich in der täglichen Arbeit sehr wohl gefühlt habe liegt zu einem großen Teil an der guten Stimmung in unserem Labor und dafür möchte ich mich ganz besonders bei Daniela Breckau, Katrin Grage, Gunhild Layer und Esther Mahlitz bedanken.

Auch dem ganzen Rest der Arbeitsgruppe Jahn möchte ich danken, denn in all der Zeit, und trotz der Größe auf die sie sich entwickelt hat, hat immer ein freundschaftlicher Ton geherrscht und mir fällt niemand ein, mit dem man nicht einen kleinen Scherz in der Kaffeepause machen könnte.

Auch in die Arbeitsgruppe Heinz an der GBF bin ich immer sehr gern gekommen, wo immer Zeit für einen kleinen Spaß war zwischen den Experimenten, sowohl mit der ersten Generation, als auch mit der zweiten Generation.

Dafür, dass ich in schwierigen Zeiten durchgehalten habe und mich die meiste Zeit in Braunschweig sehr wohl gefühlt habe, zeichnen vor allem auch meine Freunde verantwortlich, bei denen ich mich hiermit noch mal ganz besonders bedanken möchte.

Am Ende mein größter Dank geht an meine Familie, dass sie bei allen Hochs und Tiefs hinter mir gestanden haben und mich immer unterstützt haben, mit was gerade nötig war.